



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE DIFERENTES EXTRACTOS DEL LIQUEN *Parmelina tiliacea*”

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: MARÍA JOSÉ CHICAIZA CASTILLO

TUTOR: BQF. DIEGO VINUEZA

Riobamba-Ecuador

2015

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El tribunal de Trabajo de titulación certifica que: El trabajo de investigación: “**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE DIFERENTES EXTRACTOS DEL LIQUEN *Parmelina tiliacea***” de responsabilidad de la señorita María José Chicaiza Castillo, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dra. Nancy Veloz DECANA	_____	_____
Dr. Félix Andueza DIRECTOR DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA	_____	_____
BQF. Diego Vinuesa DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	_____	_____
Dr. Gerardo Medina MIEMBRO DE TRIBUNAL	_____	_____
Lda. Karen Acosta MIEMBRO DEL TRIBUNAL	_____	_____
DOCUMENTALISTA SISBIB ESPOCH	_____	_____

Yo, María José Chicaiza Castillo, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de titulación, y el patrimonio intelectual del Trabajo de titulación, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

María José Chicaiza Castillo

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen por siempre mantenerme firme en mis propósitos y haberme dado la fe y fuerza de voluntad necesaria para culminar esta etapa de mi vida.

A mis padres, hermanos y familiares, por siempre ser el refugio, el lugar donde siempre quiero regresar, mis raíces y mis cimientos.

A mis maestros, quienes compartieron tiempo y conocimientos para mi desarrollo educativo.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y a la Virgen por ser mis guías espirituales a lo largo de este camino.

A mis padres José Chicaiza e Iliana Castillo, por ser mi ejemplo de superación y lucha constante, porque gracias a ellos, hoy soy la persona que soy, reflejo de sus sacrificios y trabajo diario.

A mis hermanos, mis segundos padres, quienes han velado y han hecho de mí una mejor persona con sus consejos.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, mi lugar de estudio, por permitirme formar en lo profesional y personal.

Al BQF. Diego Vinueza por estar presente a lo largo de todo el desarrollo práctico y teórico de este Trabajo de Titulación, con su tiempo, conocimiento y apoyo.

A la Lic. Karen Acosta y al Dr. Gerardo Medina Miembro del Tribunal, por la ayuda y aporte de sus conocimientos brindados en todo el avance de este trabajo.

A mis amigos, compañeros y personas que han formado parte de mi vida, quienes me han ayudado a crecer en lo personal y a comprender que, el éxito no es suficiente, si no tienes personas con quien compartirlo.

María José

CONTENIDO

	Páginas
CERTIFICACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS	xvi
RESUMEN	xvii
SUMMARY	xviii
INTRODUCCIÓN	1
 CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	3
1.1. Antecedentes de la investigación	3
1.2. Enfermedad infecciosa	4
<i>1.2.1. Mecanismos de transmisión</i>	5
<i>1.2.2. Mecanismos de respuesta ante la infección</i>	6
<i>1.2.3. Tipos de enfermedades infecciosas</i>	7
<i>1.2.4. Agentes infecciosos</i>	8
<i>1.2.4.1. Bacterias</i>	8
<i>1.2.4.1.1. Definición</i>	9
<i>1.2.4.1.2. Estructura bacteriana</i>	10
<i>1.2.4.1.3. Clasificación</i>	11
<i>1.2.4.1.4. Enfermedades bacterianas más comunes en el Ecuador</i>	13
<i>1.2.4.1.5. Diagnóstico y Tratamiento</i>	15
<i>1.2.4.2. Hongos</i>	18
<i>1.2.4.2.1. Definición</i>	18
<i>1.2.4.2.2. Características estructurales</i>	19
<i>1.2.4.2.3. Clasificación</i>	19
<i>1.2.4.2.4. Enfermedades micóticas más comunes en el Ecuador</i>	21

1.2.4.2.5.	<i>Tratamiento</i>	21
1.3.	Cepas microbianas en estudio	22
1.3.1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	22
1.3.1.1.	<i>Morfología, virulencia y enfermedad</i>	23
1.3.1.2.	<i>Epidemiología</i>	23
1.3.1.3.	<i>Condiciones de crecimiento</i>	24
1.3.2.	<i>Escherichia coli</i>	24
1.3.2.1.	<i>Morfología, virulencia y enfermedad</i>	24
1.3.2.2.	<i>Epidemiología</i>	25
1.3.2.3.	<i>Condiciones de crecimiento</i>	25
1.3.3.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25
1.3.3.1.	<i>Morfología, virulencia y enfermedad</i>	25
1.3.3.2.	<i>Epidemiología</i>	26
1.3.3.3.	<i>Condiciones de crecimiento</i>	26
1.3.4.	<i>Proteus mirabilis</i>	26
1.3.4.1.	<i>Morfología, virulencia y enfermedad</i>	26
1.3.4.2.	<i>Condiciones de crecimiento</i>	27
1.3.5.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
1.3.5.1.	<i>Morfología, virulencia y enfermedad</i>	27
1.3.5.2.	<i>Epidemiología</i>	28
1.3.5.3.	<i>Condiciones de crecimiento</i>	28
1.3.6.	<i>Candida albicans</i>	29
1.3.6.1.	<i>Morfología, virulencia y enfermedad</i>	29
1.3.6.2.	<i>Epidemiología</i>	29
1.3.5.3.	<i>Condiciones de crecimiento</i>	30
1.4.	Hemaglutinación	30
1.4.1.	<i>Lectinas</i>	30
1.4.1.1.	<i>Definición</i>	31
1.4.1.2.	<i>Características</i>	31
1.4.1.3.	<i>Tipo de lectinas</i>	31
1.4.1.4.	<i>Aplicaciones</i>	32
1.4.1.5.	<i>Utilidad terapéutica frente al cáncer</i>	32
1.5.	Fitoterapia	33
1.5.1.	<i>Definición</i>	33
1.5.2.	<i>Métodos de extracción de componentes</i>	34
1.6.	<i>Parmelina tiliacea</i>	35

1.6.1.	<i>Líquenes</i>	35
1.6.2.	<i>Descripción botánica</i>	36
1.6.3.	<i>Taxonomía</i>	36
1.6.4.	<i>Composición química</i>	37
1.6.5.	<i>Composición fitoquímica</i>	37
1.6.6.	<i>Utilidad terapéutica</i>	39

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	41
2.1.	Muestras liquenáceas	41
2.1.1.	<i>Recolección</i>	41
2.1.2.	<i>Acondicionamiento</i>	41
2.1.3.	<i>Control de calidad</i>	41
2.1.3.1.	<i>Determinación de cenizas totales</i>	41
2.1.3.2.	<i>Determinación de cenizas solubles en agua</i>	42
2.1.3.3.	<i>Determinación de cenizas insolubles en ácido</i>	43
2.1.3.4.	<i>Determinación de humedad</i>	43
2.2.	Estudio fitoquímico	44
2.2.1.	<i>Tamizaje fitoquímico</i>	44
2.2.2.	<i>Obtención de los extractos de trabajo</i>	44
2.2.3.	<i>Análisis cromatográfico (Cromatografía en capa fina)</i>	45
2.3.	Actividad hemoaglutinante	45
2.3.1.	<i>Preparación de eritrocitos</i>	45
2.3.2.	<i>Preparación del extracto acuoso liquénico</i>	45
2.3.3.	<i>Ensayo de hemoaglutinación</i>	45
2.4.	Actividad antimicrobiana	46
2.4.1.	<i>Microorganismos, medios de cultivo y fármacos antimicrobianos</i>	46
2.4.2.	<i>Preparación de los extractos liquénicos</i>	46
2.4.3.	<i>Ensayo de Esterilidad de extractos</i>	47
2.4.4.	<i>Activación y acondicionamiento de cepas antimicrobianas</i>	47
2.4.5.	<i>Preparación de sustancias antimicrobianas</i>	47
2.4.6.	<i>Ensayo antimicrobiano- Método de microgotas</i>	47
2.4.7.	<i>Ensayo antimicrobiano- Método de difusión de discos</i>	48

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	49
3.1.	Muestras liquenáceas	49
3.2.	Análisis fitoquímico	50
3.2.1	<i>Tamizaje fitoquímico</i>	50
3.2.2.	<i>Análisis cromatográfico</i>	51
3.3.	Actividad hemoaglutinante	53
3.4.	Actividad antimicrobiana	55
3.4.1.	<i>Método de microgotas</i>	55
3.4.2.	<i>Método de difusión de discos</i>	57
	CONCLUSIONES	60
	RECOMENDACIONES	61
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC	American type culture collection
BHI	Brain Heart infusión
C. a.	<i>Candida albicans</i>
CDC	Ceftriaxona disco comercial
CIM	Concentración inhibitoria media
CFU	Unidades formadoras de colonias
CT	Ceftriaxona taza
D1	Dilución ½
D2	Dilución ¼
D3	Dilución 1/8
D4	Dilución 1/16
D5	Dilución 1/32
D6	Dilución 1/64
D7	Dilución 1/128
D8	Dilución 1/256
D9	Dilución 1/512
DDD	Dosis diaria definida
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EA1	Extracto alcohólico sin diluir
EA2	Extracto alcohólico ¼
EA3	Extracto alcohólico 1/10
EA4	Extracto alcohólico 1/100
EAEC	<i>Escherichia coli</i> anteroagregativo
EAC	Extracto acuoso
EAT	Extracto de acetato de etilo sin diluir
E. C.	<i>Escherichia coli</i>
EC1	Extracto cetónico sin diluir
EC2	Extracto cetónico diluido ¼
EDA	Enfermedad diarreica aguda
EDC	Eritromicina disco comercial

EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágico
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasivo
EMB	Eosina azul de metileno
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógeno
ET	Eritromicina taza
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénico
FEUM	Farmacopea Estados Unidos Mexicanos
FemX	melanoma humano
HPLC	High performance liquid chromatography
HIV	Virus de inmunodeficiencia adquirida
INEC	Instituto nacional de estadísticas y censos
IRAs	Infecciones respiratorias agudas
K. p.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KDC	Ketoconazol disco comercial
KT	Ketoconazol taza
LS174	Carcinoma de colon humano
mg	Miligramos
mL	Mililitros
NK	Natural Kill
OMS	Organización mundial de la salud
OPS	Organización panamericana de la salud
P. a.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBP	Proteína de unión a la penicilina
pH	Potencial de hidrógeno
P. m.	<i>Proteus mirabilis</i>
RIP II	Proteínas inhibidoras de ribosomas de tipo tóxica con efecto aglutinante
RPM	Revoluciones por minuto
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a la meticilina
S. a.	<i>Staphylococcus aureus</i>
TLC	Thin layer chromatography
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
UV	Luz ultravioleta
Ø	Diámetro

ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1-1: Ejemplos de los mecanismos de transmisión	5
Tabla 2-1: Componentes que actúan durante la Inmunidad Innata	6
Tabla 3-1: Listado de algunas bacterias y sus principales síntomas	8
Tabla 4-1: Clasificación micro-macroscópica de las bacterias	12
Tabla 5-1: Clasificación metabólica, antigénica y genética	12
Tabla 6-1: Bacterias causantes de EDAs	14
Tabla 7-1: Principales microorganismos causantes de infecciones nosocomiales ..	14
Tabla 8-1: Principales medicamentos inhibidores de la pared celular con su respectivo mecanismo de acción	16
Tabla 9-1: Listado de algunos fármacos pertenecientes el grupo de betalactámicos	17
Tabla 10-1: Espectro de actividad de medicamentos inhibidores de las síntesis de proteínas	17
Tabla 11-1: Listado de algunos fármacos inhibidores de las proteínas	18
Tabla 12-1: Listado de fármacos del grupo de las quinolonas	18
Tabla 13-1: Listado de hongos causantes de diferentes micosis	20
Tabla 14-1: Listado de antifúngicos con su respectivo mecanismo de acción	21
Tabla 15-1: Funciones de algunos de los componentes estructurales de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
Tabla 16-1: Estudios <i>in vivo</i> de lectinas y efectos sobre el cáncer	33
Tabla 17-1: Taxonomía <i>Parmelina tiliacea</i>	36
Tabla 18-1: Porcentaje de metabolitos primarios de <i>Parmelina tiliacea</i>	37
Tabla 19-1: Composición fitoquímica <i>Parmelina tiliacea</i>	37
Tabla 20-1: Compuestos liquénicos y sus efectos terapéuticos	40
Tabla 1-3: Resultados obtenidos de parámetros de control de calidad de la droga seca y triturada de <i>Parmelina tiliacea</i>	49
Tabla 2-3: Resultados del tamizaje fitoquímico del liquen <i>Parmelina tiliacea</i>	50
Tabla 3-3: Resultados de la cromatografía en capa fina de los extractos del liquen <i>Parmelina tiliacea</i>	52
Tabla 4-3: Resultados de la primera réplica de la actividad hemoaglutinante del extracto acuoso del liquen <i>Parmelina tiliacea</i>	53
Tabla 5-3: Resultados de la segunda réplica de la actividad hemoaglutinante del	

	extracto acuoso del liquen <i>Parmelina tiliacea</i>	53
Tabla 6-3:	Resultados de la tercera réplica de la actividad hemoaglutinante del extracto acuoso del liquen <i>Parmelina tiliacea</i>	53
Tabla 7-3:	Datos de esterilidad de los extractos	55
Tabla 8-3:	Actividad antimicrobiana del control de solventes-Método de microgotas	55
Tabla 9-3:	Actividad antimicrobiana del control de antibióticos-Método de microgotas	56
Tabla 10-3:	Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>Parmelina tiliacea</i> -Método de microgotas	56
Tabla 11-3:	Actividad antimicrobiana del control de solventes-Método de difusión de discos	57
Tabla 12-3:	Actividad antimicrobiana del control de antibióticos-Método de difusión de discos	57
Tabla 13-3:	Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>Parmelina tiliacea</i> -Método de difusión de discos	58

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1-1: Tipos de inmunidad adaptiva	7
Figura 2-1: <i>Escherichia coli</i>	8
Figura 3-1: Árbol filogénico de la vida	9
Figura 4-1: Composición estructural de bacterias	10
Figura 5-1: Componentes de la pared celular bacteriana Gram positiva	11
Figura 6-1: Componentes de la pared celular bacteriana Gram negativa	11
Figura 7-1: Clasificación micro-macroscópica bacteriana	13
Figura 8-1: Protocolo de identificación microbiana	15
Figura 9-1: Estructura química de los β -lactámicos	16
Figura 10-1: Estructura de la pared celular de los hongos	19
Figura 11-1: Lugar de acción de los antifúngicos	22
Figura 12-1: Vista macroscópica <i>Staphylococcus aureus</i>	22
Figura 13-1: Vista microscópica <i>Staphylococcus aureus</i>	23
Figura 14-1: <i>Escherichia coli</i>	24
Figura 15-1: <i>Klebsiella pneumoniae</i>	25
Figura 16-1: <i>Proteus mirabilis</i>	26
Figura 17-1: Vista microscópica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
Figura 18-1: Vista macroscópica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
Figura 19-1: Vista microscópica <i>Candida albicans</i>	29
Figura 20-1: Reacción de aglutinación	30
Figura 21-1: Representación esquemática de los tres tipos de lectinas	32
Figura 22-1: Métodos de extracción	34
Figura 23-1: Rutas metabólicas de los metabolitos secundarios del líquen	38
Figura 24-1: Metabolitos secundarios presentes en <i>Parmelina tiliacea</i>	38
Figura 25-1: Estructura base de algunas sustancias liquénicas	39
Figura 1-2: Fórmula de cenizas totales	42
Figura 2-2: Fórmula de cenizas solubles en agua	42
Figura 3-2: Fórmula de cenizas insolubles en ácido clorhídrico	43
Figura 4-2: Fórmula de humedad	43
Figura 1-3: Cromatografías en capa fina vista con luz UV de onda corta del líquen <i>Parmelina tiliacea</i>	51

Figura 2-3:	Cromatografía en capa fina, luz UV de onda larga del líquen	
	<i>Parmelina tiliacea</i>	52

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** Recolección y acondicionamiento del líquen
- ANEXO B:** Control de calidad del líquen y obtención de extractos
- ANEXO C:** Análisis fitoquímico de *Parmelina tiliacea* (tamizaje fitoquímico, TLC)
- ANEXO D:** Prueba de hemaglutinación (Preparación de hematíes y extracto líquénico)
- ANEXO E:** Resultado hemaglutinación (Formación de pequeños gránulos)
- ANEXO F:** Control de esterilidad de extractos
- ANEXO G:** Estudio antimicrobiano-Método microgotas
- ANEXO H:** Estudio antimicrobiano-Método de difusión de discos
- ANEXO I:** Sensibilidad de *Staphylococcus aureus* al extracto de acetato de etilo. Método de microgota-Método de difusión de disco. (Izq.-derecha)

RESUMEN

Este trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de diferentes extractos del líquen *Parmelina tiliacea* y determinar la presencia de lectinas realizando la actividad hemoaglutinante del líquen. Durante el período Junio-Agosto 2015 se trabajó con cuatro extractos líquénicos de: acetona, alcohol, acetato de etilo y agua, todos obtenidos por reflujo, calor y evaporados a sequedad. La actividad antimicrobiana se realizó a través de los métodos de: microgota y difusión de discos, utilizando los extractos disueltos en Dimetil Sulfóxido (DMSO) y diluciones de estos, contra microorganismos American type culture collection (ATCC) de: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Candida albicans*, esta actividad fue comparada con estándares de antimicrobianos: ceftriaxona (30µg), eritromicina (15µg), ketoconazol (25µg) y con controles negativos: agua estéril y DMSO. Para la actividad hemoaglutinante se trabajó con el extracto acuoso y sus diluciones utilizando además una suspensión de hematíes al 5% de los grupos sanguíneos (O⁺, A⁺, B⁺, AB⁺). El efecto antimicrobiano fue estimado midiendo los halos de inhibición, mientras que la presencia de lectinas se valoró de acuerdo a la intensidad de aglutinación que sufrieron los hematíes. Se concluye que todos los extractos tienen acción antimicrobiana *in vitro* para al menos una cepa ATCC, exceptuando a la bacteria *Escherichia coli*, la cual no fue inhibida por ningún extracto. El tipo de microorganismo y la naturaleza del extracto son factores que establecieron el potencial antimicrobiano, así el extracto de acetato de etilo del líquen *Parmelina tiliacea* presentó la mayor actividad contra *Staphylococcus aureus*, también se determinó que hay lectinas siendo parte de la composición del líquen y a pesar de no encontrarse en altas concentraciones. Se recomienda estudiar su efecto como tratamiento para el cáncer, además de realizar una investigación exhaustiva sobre su composición aminoacídica.

Palabras claves: <LIQUEN [*Parmelina tiliacea*]> <ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA>
<LECTINAS> <ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE> <MÉTODO DE MICROGOTAS>
<MÉTODO DE DIFUSIÓN DE DISCOS>

SUMMARY

This research aimed to evaluate the *in vitro* Antimicrobial activity of different *Parmelina tiliacea* lichen extracts and determine the presence of lectins performing a Lichen haemagglutinating activity. During the period June-August 2015, it was worked with four lichen extracts: alcohol, acetone, ethyl acetate and water, all obtained by reflux, heat and evaporated to dryness. The antimicrobial activity was performed using methods such as: micro-drop and disc diffusion using dissolved extracts in Dimethyl Sulfoxide (DMSO) and dilutions of these, against microorganisms American Type Culture Collection (ATCC) of: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Candida albicans*, this activity was compared with antimicrobial standards like: ceftriaxone (30 µg), erythromycin (15µg), ketoconazole (25µg), and negative controls like: DMSO, sterile water. For haemagglutinating activity, it was used the aqueous extract and their dilutions using a suspension of erythrocytes in 5% of blood groups (O⁺, A⁺, B⁺, AB⁺). The antimicrobial effect was measured by aura inhibitors, while the presence of lectins was assessed according to the intensity of agglutination that erythrocytes suffered. It is concluded that all extracts have *in vitro* antimicrobial action for the least one ATCC strain, except for the *Escherichia coli* bacterium, which was not inhibited by any extract. The type of microorganism and the nature of the extract are factors which established antimicrobial potential and the ethyl acetate extract of *Parmelia tiliacea* lichen showed the highest activity against *Staphylococcus aureus*, also it was determined that there are lectins being part of Lichen composition, despite the lack of its presence in high concentrations. It is recommended to study their effect as a treatment for cancer as well as to perform a thoroughly research of their amino acid composition.

Key words: <LICHEN [*Parmelina tiliacea*]> <ANTIMICROBIAL ACTIVITY >
<LECTINS> <HAEMAGGLUTINATING ACTIVITY > <MICRO-DROP METHOD > <DISC
DIFFUSION METHOD >

INTRODUCCIÓN

Aproximadamente 13.3 millones de personas es decir el 26% de la población mundial muere a causa de alguna enfermedad infecciosa, mientras que 8 millones por el cáncer. Las enfermedades de las vías respiratorias bajas son la única causa infecciosa que provoca muerte en países desarrollados, mientras que las infecciones del tracto respiratorio, diarrea e infecciones nosocomiales constituyen las causas de muerte en países en vías de desarrollo. (WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2015. p. 55).

En el Ecuador las enfermedades de origen microbiano están a la orden del día, se encuentran dentro de las diez primeras causas de morbilidad, según datos del INEC las EDA y las IRA son las más prevalentes en el país, la tasa de mortalidad a causa de las EDA en el año 2004 fue de 21.8 por cada mil nacidos, y la meta para el 2015 es de 14.4, mientras que las IRAs presentan una tasa de mortalidad de 56.0% a nivel de Latinoamérica, manteniéndose alta. (SANOFI. 2013. <http://www.sanofi.com.ec>)

La prevalencia de las EDA e IRAs se concentra en las regiones rurales de la Sierra y Amazonía, y va del 30% y 50% respectivamente, en las zonas rurales de la provincia de Chimborazo la historia no es diferente, las EDA e IRAs son las principales causantes de morbilidad y mortalidad infantil, que en un 61.1% son tratadas con remedios caseros y tan solo un 27.8% son tratadas con antimicrobianos de origen sintético. (SANOFI. 2013. <http://www.sanofi.com.ec>)

Mientras que el cáncer en Ecuador es la segunda causa de muerte, según SOLCA (Solca. 2013. <http://www.estadisticas.med.ec/webpages/index.jsp>) en el país se presentan 134.9 casos de cáncer en mujeres y 125.9 casos de cáncer hombres por cada 100.000 habitantes, siendo el cáncer de mama, piel y útero los que afectan más a las mujeres y el cáncer de próstata, piel y estómago al hombre, siendo tratadas en su gran mayoría con medicamentos de origen sintético.

La terapia medicamentosa constituye tanto para las enfermedades infecciosas como para el cáncer los medios para aliviar síntomas y buscar la cura de la enfermedad. El problema radica en la automedicación de los antimicrobianos y el elevado costo y desabastecimiento de antineoplásicos en el país.

Los antimicrobianos son el método de primera elección para tratar las enfermedades infecciosas a nivel mundial, se dice que se producen más de 50 millones de prescripciones y se consumen más de 250 millones de DDD de antimicrobianos cada año, el problema es la automedicación,

que genera el apareamiento de “supermicroorganismos”, dando lugar a una enfermedad prolongada, aumentando el riesgo de muerte y resultando más costosa, el panorama se agrava aún más debido a que hace 25 años que no se ha descubierto nuevos antibióticos. (HISHAM, Z., et al. 2000. p.33).

El desabastecimiento de antineoplásicos constituye también un grave problema, muchos de los pacientes requieren medicamentos que el país ha dejado de importar, o cuyo valor se ha duplicado por la misma razón, siendo una de las causas por las que el Ecuador apunta a la investigación y desarrollo de antineoplásicos y otros medicamentos accionados bajo el plan del Buen Vivir estipulado en la sección octava de ciencia, tecnología y saberes ancestrales de la constitución del Ecuador, donde impulsa a recuperar, fortalecer y potenciar los saberes ancestrales.

Una de las alternativas es el uso de productos naturales con potencial para producción de fitomedicamentos, como la *Parmelina tiliacea* perteneciente a una familia de líquenes cuya acción antimicrobiana ha sido probada en la Universidad de Serbia y cuyos antecedentes bibliográficos daban indicio de la presencia de lectinas en su composición, razón por la que se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de diferentes extractos y se determinó la actividad hemoaglutinante. (NEDELJKO, Manojlovic, et al. 2012. p.1)

En la investigación se utilizaron cuatro extractos: cetónico, alcohólico, acuoso y extracto de acetato de etilo, que fueron obtenidos por reflujo, calor y evaporados a sequedad, con el extracto acuoso y sus diluciones, se realizó la actividad hemoaglutinante utilizando además una suspensión de hematíes al 5% de los grupos sanguíneos (O⁺, A⁺, B⁺, AB⁺), mientras que con los cuatro extractos reconstituidos en DMSO y sus diluciones, se determinó la actividad antimicrobiana utilizando dos métodos : Método de microgotas y método de difusión de discos, la actividad se testeó contra seis cepas de microorganismos Gram positivos y negativos, estos resultados fueron comparados con estándares de antibióticos y controles negativos. La actividad antimicrobiana se valoró midiendo los halos de inhibición, en tanto que la presencia de lectinas se valoró de acuerdo a la intensidad de aglutinación que sufrieron los hematíes.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Antecedentes de la investigación

Los líquenes se han utilizado en la medicina popular de muchos países alrededor del mundo, durante un considerable período de tiempo. Su eficacia está dada por la síntesis única de metabolitos secundarios de origen fúngico que presentan funciones biológicas importantes como agente antiinflamatorio, antioxidante, antibacteriano, citotóxico y antitumoral. (RANKOVIC, Branislav. 2015. pp. 5-6).

La primera investigación sobre el estudio químico de líquenes fue hecho por Friedrich Wilhelm, dando comienzo a una exhaustiva búsqueda de métodos que permitan separar e identificar sus compuestos, así hasta Junio del 2012 se reportaron 1050 sustancias liquénicas, de las cuales la mayoría son de tipo fenólico, aunque de acuerdo a su lugar de procedencia hay ciertas modificaciones, como los líquenes de Asia Central que presentan metabolitos secundarios halogenados o depsipéptidos cíclicos hallados en una especie endémica de las Islas Galápagos. (RANKOVIC, Branislav. 2015. pp. 5-6).

De forma particular no existen investigaciones sobre el liquen *Parmelina tiliacea*, a excepción de la tesis realizada en el año 2015 en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, sobre la actividad antiinflamatoria y citotóxica *in vitro* de las fracciones aisladas por cromatografía preparativa en capa fina, pero específicamente sobre la evaluación de la actividad antimicrobiana, no se halla información, existe sí, pero de otras especies, y géneros cercanos.

En la Universidad de Serbia Nedeljko, realizó un estudio de la composición química, efecto antioxidante, antimicrobiano y citotóxico de los metabolitos más importantes hallados en extractos cetónicos de tres especies de *Parmelia*, *P. caperata*, *P. saxatilis*, *P. sulcata*, en donde mediante el método HPLC-UV halló compuestos fenólicos predominantes como el: ácido salazínico, ácido úsnico y atranorina, además de concluir que los extractos liquenáceos presentaban mayor efecto antibacteriano que antifúngico debido a características estructurales de los microorganismos. (NEDELJKO, Manojlovic, et al. 2012. p.1.).

El mismo enfoque tuvieron otras investigaciones, donde evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos cetónicos de varios líquenes del sur de España contra cepas bacterianas Gram positivas y negativas, obteniendo un mayor efecto contra las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus*. (SÁENZ, M., et al. 2006. p. 158).

Aún no se tiene respuesta a la interrogante de si este efecto está dado por la acción de un compuesto en particular o por la acción sinérgica de todos ellos, en el mismo estudio, trabajó con extractos fluidos y compuestos fraccionados, obteniendo una mayor inhibición microbiana en compuestos aislados, coincidiendo con la información bibliográfica en la cual sugieren que este efecto se debe a la presencia de depsidones. (ANDERSON, René. 2006. p.58).

En cuanto a las lectinas liquénicas sus estudios han sido enfocados al mecanismo de reconocimiento, más no al potencial efecto anticancerígeno, el cual, en especies vegetales sugieren que su acción se debe a la capacidad de modular el crecimiento, diferenciación y apoptosis, además de inhibir las síntesis de DNA, RNA y proteínas. (CASTILLO, Adriana., et al. 2005. pp. 56-61).

Por ejemplo investigaciones *in vitro* de extractos de haba (leguminosa rica en lectina) en tres líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal se describe una inhibición reversible de la proliferación de estas líneas celulares, efecto que se potencia con la dosis. (CASTILLO, Adriana., et al. 2005. pp. 56-61).

Mientras que investigaciones *in vivo* en ratones inducidos tumores de linfoma no-Hodking se observó la disminución de la masa de los tumores, demostrando el efecto de las lectinas, pero a la vez insertando dudas sobre si en realidad el efecto es anticancerígeno o inmunomodulador pues su acción está asociada con la activación de células NK y macrófagos. (CASTILLO, Adriana., et al. 2005. pp. 56-61).

1.2. Enfermedad infecciosa

Es una expresión o manifestación clínica que presenta el huésped por causa de una infección, muchas veces el término infección y colonización son erróneamente utilizados, la infección es presencia y multiplicación de un determinado microorganismo en el tejido de un huésped en donde no hay expresión clínica, pero si respuesta inmunitaria, mientras que la colonización es solo la permanencia de un microorganismo o agente causal sobre una determinada zona del

huésped sin producción de manifestaciones clínicas ni respuestas inmunitarias. (RUIZ, V., et al. 2005. pp. 10-16).

Pasteur y Koch los creadores de la teoría microbiana de la enfermedad llegaron a la conclusión de que, cada enfermedad es producida por un determinado microorganismo, y que cada uno de estos provoca una enfermedad distinta. (RUIZ, V., et al. 2005. pp. 10-16).

1.2.1. Mecanismos de transmisión

Puede darse por:

❖ Transmisión directa

❖ Transmisión indirecta

El paso de la enfermedad de la fuente de infección hacia una persona sana idónea, sin interferencia y de manera inmediata se conoce como transmisión directa, mientras que cuando hay un periodo de tiempo y espacio entre el paso de la enfermedad desde la fuente de infección hacia una persona susceptible se conoce con el nombre de transmisión indirecta.

La transmisión directa puede darse por medio del aire, mordeduras y arañazos, siendo el aire el medio más reiterado, en tanto que la transmisión indirecta puede estar mediada por agentes externos como el polvo, el agua e incluso los alimentos. (ANDERSON, R. 1991. pp. 6-8).

Tabla 1-1: Ejemplos de los mecanismos de transmisión.

TRANSMISIÓN DIRECTA		TRANSMISIÓN INDIRECTA	
MEDIO	ENFERMEDAD	MEDIO	ENFERMEDAD
Mucosas	Enfermedades de transmisión sexual	Alimentos	Salmonelosis
Cutánea	Herpes tipo I	Vectores	Paludismo
Tos	Tuberculosis		
Sangre	Hepatitis B		

Fuente: (RUIZ, V., et al. 2005).

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

1.2.2. Mecanismos de respuesta ante la infección

Son mecanismos en los que el cuerpo trata de proteger al huésped de contraer una enfermedad infecciosa, estas barreras tratan de impedir la entrada de agentes infecciosos y la propagación de la enfermedad.

Estos son barreras mecánicas y respuestas inmunes.

Barreras mecánicas:

- ❖ Piel
- ❖ Esfínteres
- ❖ Epiglotis
- ❖ Flora endógena
- ❖ pH gástrico

Respuestas inmunes:

Son respuestas generadas por el sistema inmunitario hacia agentes que el cuerpo no reconoce por ejemplo: bacterias, virus, parásitos, hongos o cualquier sustancia exógena. Dentro de ellas encontramos las reacciones innatas y las adaptivas, siendo las reacciones innatas las defensas de primera línea que existen antes de la memoria inmunitaria.

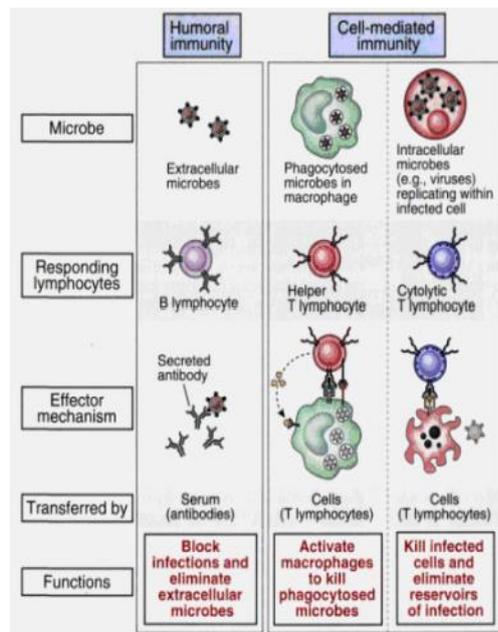
Tabla 2-1: Componentes que actúan durante la Inmunidad Innata.

COMPONENTES	FUNCIONES
Barreras epiteliales	Previenen la entrada de microorganismos al cuerpo y participan en la destrucción de ellos.
Células efectoras (neutrófilos, macrófagos, Células NK)	Participan en la fagocitosis y destrucción de microorganismos en las fases iniciales y tardías de las enfermedades infecciosas, mediante la activación de macrófagos.
Proteínas efectoras (Complemento, lectinas asociadas a Manosa, PCR y factores de coagulación)	Destrucción de microorganismos mediante la activación de leucocitos, lectinas y aislamiento de tejidos afectados por la infección.

Fuente: (BRANDAN, Nora. 2007).
Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

Y la inmunidad adaptiva que es un conjunto de respuestas protectoras mucho más evolucionadas, que se generan luego de cada exposición a un agente infeccioso, y cuya respuesta es más intensa con cada nueva exposición.

Figura 1-1: Tipos de inmunidad adaptiva



Fuente: (BRANDAN, Nora. 2007).

1.2.3. Tipos de enfermedades infecciosas

Se divide de acuerdo al tipo de agente infeccioso que cause la enfermedad así tenemos:

- ❖ Enfermedades bacterianas
- ❖ Enfermedades fúngicas
- ❖ Enfermedades parasitarias
- ❖ Enfermedades víricas

De estas cuatro centraremos el estudio en enfermedades bacterianas y fúngicas.

Las infecciones bacterianas son enfermedades causadas por bacterias ajenas a la flora natural de una zona de nuestro cuerpo como en el caso de infecciones causadas por *Escherichia coli*, bacterias que colonizan el colón, pero que también son causantes de infecciones urinarias e incluso diarrea al existir el incremento de la carga microbiana, o por bacterias patógenas como *Klebsiela pneumoniae* principal causante de la neumonía.

Tabla 3-1: Listado de algunas bacterias y sus principales síntomas.

BACTERIA	SÍNTOMAS
<i>Salmonella typhimurium</i>	Diarrea, dolor abdominal, vómitos y fiebre.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Náuseas, vómito, dolor abdominal, debilidad, deshidratación.
<i>Escherichia coli</i>	Dolor abdominal, vómito, diarrea, deshidratación, fiebre.

Fuente: (ZÁRATE. 2013).

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

Por otro lado las infecciones fúngicas son enfermedades causadas por hongos, el huésped se puede infectar por micosis o por toxomicosis, se habla de micosis cuando la infección es causada directamente por el microorganismo, donde este invade el tejido del huésped, mientras que la toxomicosis es una infección causado por toxinas generadas por el microorganismo. (ZÁRATE, Manuel. 2013. p. 5).

1.2.4. Agentes infecciosos

Son microorganismos causantes de la infección, estos pueden cruzar las barreras protectoras del huésped y afectarlo produciendo enfermedad.

Dentro de estos tenemos a:

- ❖ Virus
- ❖ Bacterias
- ❖ Hongos
- ❖ Parásitos (Muñoz, Sanz. 1995. pp. 33-34)

1.2.4.1 Bacterias



Figura 2-1: *Escherichia coli*.

Fuente: (PELCZAR, Michael. 1985).

1.2.4.1.1. Definición

Son organismos formados por células procariotas, cuya reproducción es por fisión binaria, su tamaño va aproximadamente de: 0,5-5 μ m, son los organismos más abundantes, tanto que se cree que hay 5x10³⁰ bacterias en todo el planeta Tierra. En lo estructural carecen de membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplasmático. (PELCZAR, Michael. 1985. p. 9).

Las bacterias al igual que todos los microorganismos están en todas partes, en el aire, en las superficies de los suelos, en el agua, incluso en desechos humanos que fueron huéspedes de algunos de ellos y alimentos, en cualquier lugar donde se cumplan todas las condiciones para su supervivencia, allí encontrarán: alimento, humedad y temperatura adecuada para su desarrollo y multiplicación. (PELCZAR, Michael. 1985. p. 9).

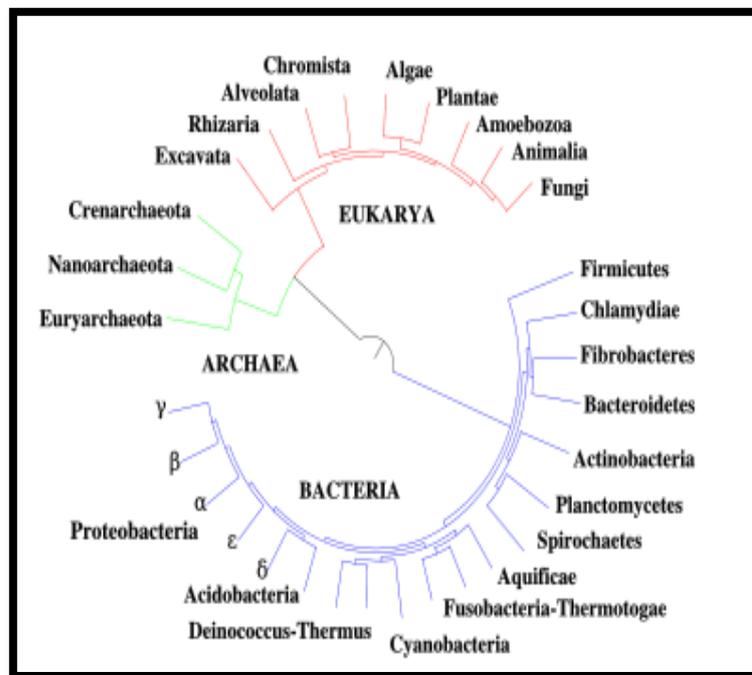


Figura 3-1: Árbol filogenético de la vida
Fuente: (MURRAY, Patrick., et al. 2009)

Los seres vivos se dividen en tres dominios: Eukarya, Archaea y Bacteria, donde los dominios Archaea y Bacteria incluyen organismos procariotes siendo el dominio Bacteria el más amplio. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. p. 13).

1.2.4.1.2. Estructura bacteriana

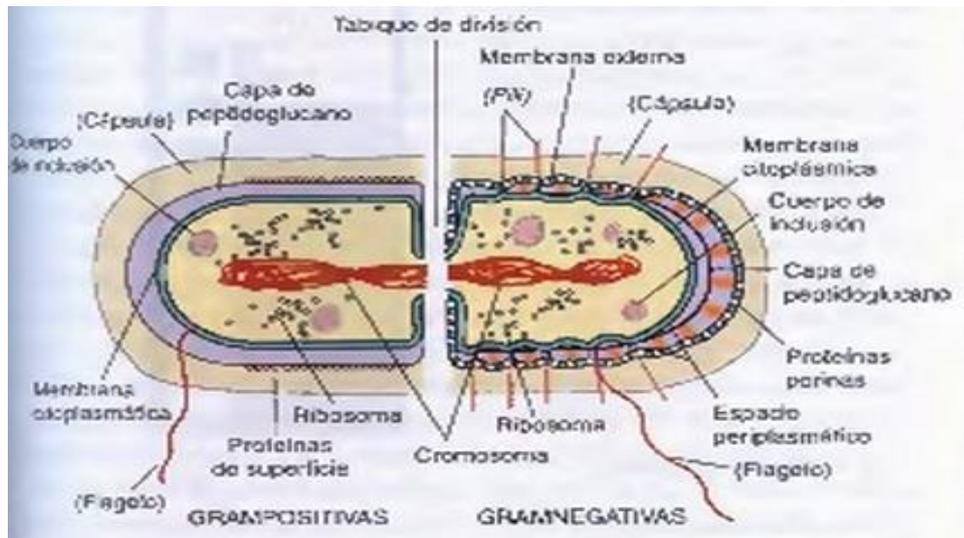


Figura 4-1: Composición estructural de bacterias

Fuente: (MURRAY, Patrick., et al. 2009).

El citoplasma contiene: ribosomas, proteínas, ARNm y ADN cuyos cromosomas no se encuentran contenidos en una membrana nuclear, sino más bien en una zona a la que llaman nucleoide, al tener ausente una membrana nuclear estos han adaptado procesos de transcripción y traducción, como mecanismos para controlar la síntesis de proteínas, en cuanto a los ribosomas estos organismos poseen dos subunidades en ellos: la subunidad 30S y 50S. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. p. 18).

La membrana plasmática muy similar a la que presentan las eucariotas, poseen una bicapa lipídica con la diferencia que hay ausencia de esteroides y cumplen funciones de: protección, transporte, producción de energía y en el caso de las actinas (filamentos proteicos) dando forma a la bacteria. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 18-19).

La pared celular difiere de acuerdo al tipo que esta pertenezca, en el caso de bacterias Gram positivas la pared es gruesa y constituida casi en su totalidad por peptidoglucano (mureína) cuya función es permitir la difusión de metabolitos y mantener la presión osmótica de la célula, además la pared celular de estas bacterias poseen polisacáridos tipo C (ácido teicoico, ácido lipoteicoico) asociados al peptidoglucano, mientras que las bacterias Gram negativas a pesar de tener una fina capa de peptidoglucano son mucho más complejas de forma estructural y bioquímica, al poseer dos capas externas a la membrana citoplasmática en las que se encuentran: fosfolípidos, porinas, lipoproteínas y lipopolisacáridos, estas dos capas forman un espacio periplásmico con enzimas que transportan, degradan y sintetizan, por todos estos

componentes el ataque a una bacteria Gram negativa es mucho más difícil. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 19-20).

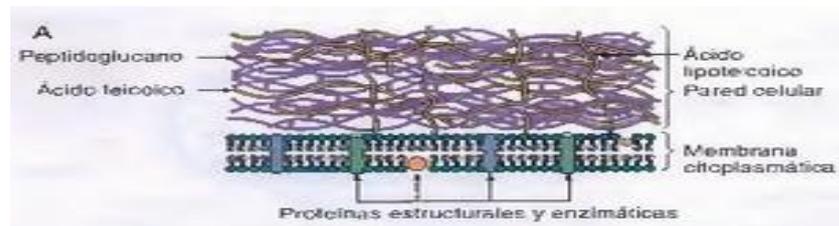


Figura 5-1: Componentes de la pared celular bacteriana Gram positiva
Fuente: (MURRAY, Patrick., et al. 2009)

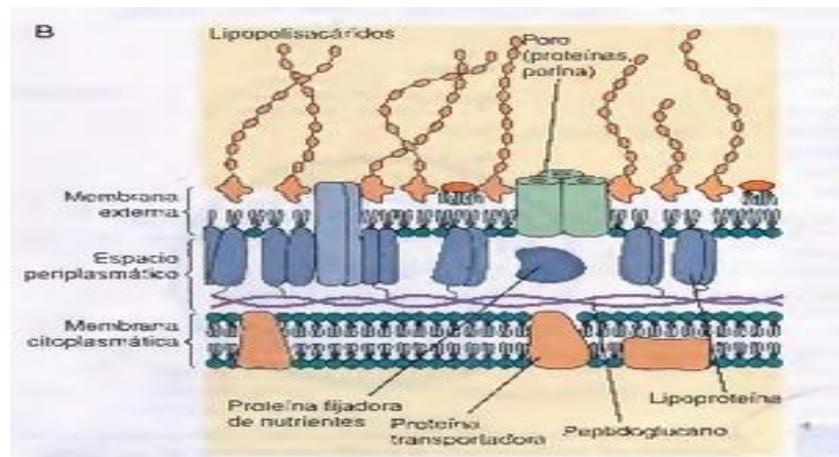


Figura 6-1: Componentes de la pared celular bacteriana Gram negativa
Fuente: (MURRAY, Patrick., et al. 2009)

Algunas bacterias también presentan estructuras externas como: cápsulas, Pili, flagelos y proteínas. Las cápsulas o glucocálix están constituidas de proteína y polisacáridos con función protectora, mientras que los flagelos y Pili (fimbrias) están formados por estructuras de origen únicamente proteico, la flagelina presente en los flagelos y la pilina en las fimbrias, así los flagelos son los encargados de la motilidad de la célula y las fimbrias de la adhesión. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 22-23).

1.2.4.1.3. Clasificación

Las bacterias pueden clasificarse de acuerdo a la diferenciación micro-macroscópica y a la diferenciación metabólica, antigénica y genética.

Tabla 4-1: Clasificación micro-macroscópica de las bacterias.

MORFOLOGÍA	CAPACIDAD DE CAPTACIÓN DE LOS COLORANTES GRAM
Cocos	Gram positivas
Bacilos	Gram Negativas
Espirilos	

Fuente: (PELCZAR, Michael. 1985)

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

Por su morfología bacterias en forma ovalada llevan el nombre de cocos, bacterias con forma de bastón se llaman bacilos y las de forma espiral las denominamos espirilos; ahora de acuerdo a la captación de los colorantes Gram hay dos tipos de bacterias: Gram positivas y Gram negativas, las Gram positivas presentan una coloración violeta debido a que el colorante queda atrapado en la gruesa capa de peptidoglicano, a diferencia de las negativas cuyo color rosado es el resultado de la poca fijación del colorante a la fina capa de peptidoglicano. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 16-17).

Tinción Gram, técnica diferencial donde se utiliza: cristal violeta (colorante), yodo (precipita junto con el cristal violeta), alcohol cetona (decolorante) y safranina (contraste). (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 16-17).

Tabla 5-1: Clasificación metabólica, antigénica y genética.

REQUERIMIENTO DE OXÍGENO	TEMPERATURA	pH	FORMA DE NUTRICIÓN
Aerobias estrictas	Termófilas	Acidófilas	Autótrofas
Anaerobias estrictas	Mesófilas	Neutrófilas	Heterótrofas
Anaerobias facultativas	Psicrófilas	Basófilas	

Fuente: (PELCZAR, Michael. 1985)

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

Las bacterias aerobias estrictas necesitan de aporte de O₂, anaerobias estrictas se reproducen en zonas ausentes de O₂ y anaerobias facultativas se desarrollan en presencia o ausencia de O₂.

Bacterias termófilas se desarrollan entre 25-80°C, bacterias Mesófilas 10-45°C y las psicrófilas de -5-30°C.

De acuerdo al pH las Acidófilas se desarrollan a pH entre 1-5, las Neutrófilas a pH 5.5-8.5 y Basófilas de 9-10 y por su formas de nutrición, autótrofas, bacterias que se alimentan de

compuestos inorgánicos mientras que, las bacterias heterótrofas se alimentan de carbono orgánico. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 16-17).

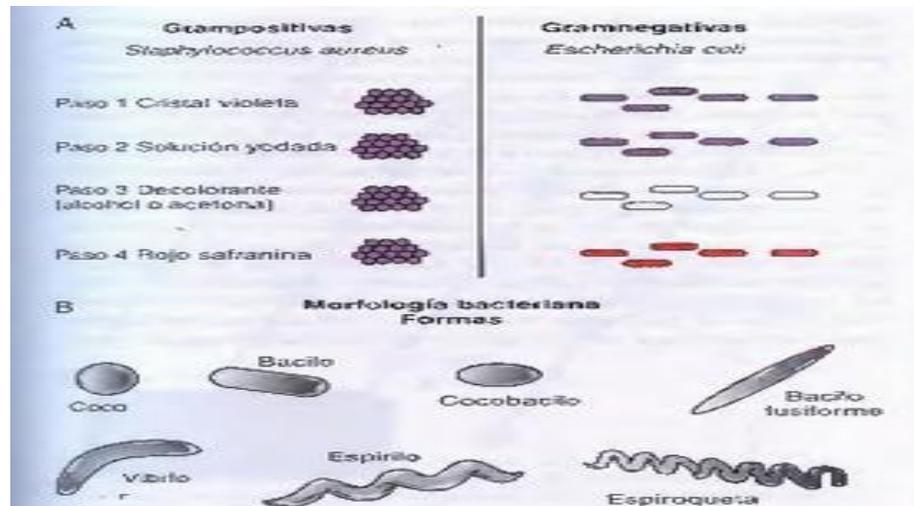


Figura 7-1: Clasificación micro-macroscópica bacteriana
Fuente: (MURRAY, Patrick., et al. 2009)

1.2.4.1.4. Enfermedades bacterianas más comunes en el Ecuador.

Según datos del INEC las EDA y las IRA son las más prevalentes en el país y en las zonas rurales de la provincia de Chimborazo, las EDA e IRAs son las principales causantes de la morbilidad y mortalidad infantil, sin olvidar el incremento de la incidencia de infecciones nosocomiales en las últimas décadas dadas por ciertas condiciones en los centros de salud las cuales facilitan la transmisión de bacterias multirresistentes. (SANOFI. 2013. <http://www.sanofi.com.ec>).

Las EDAs se las definen como una alteración en la forma normal de evacuación intestinal, existiendo con este, aumento de la frecuencia de deposición o cambios en la consistencia de la materia fecal con una duración menor a 15 días. (SHANCHEZ, Carlos. 2011. pp. 23-24)

Una de las causas de las EDAs son las infecciones causadas por microorganismos, siendo la infección bacteriana la más común, en donde *Escherichia coli* es la causante del 70% de las infecciones diarreicas. (SHANCHEZ, Carlos. 2011. pp. 25-26)

Tabla 6-1: Bacterias causantes de EDAs.

BACTERIAS
<i>Escherichia coli</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Shigella spp</i>

Fuente: (SHANCHEZ, Carlos. 2011)

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

Mientras que las IRAs son enfermedades que afectan principalmente al tracto respiratorio y son causadas en su mayoría por virus y en menor grado por bacterias como: *Streptococcus β hemolítico* del grupo A, *Staphylococcus aureus* (ambas afectan al tracto respiratorio superior) y *Klebsiella pneumoniae* (afectan al tracto respiratorio inferior). (GUZMÁN, L., et al. 2005. p. 57).

Aunque con menos tasa de morbilidad las infecciones nosocomiales constituyen también un blanco de cuidado ya que estas generan un gasto extra al provocar resistencia a ciertos antibióticos, dentro de las infecciones nosocomiales tenemos a: Bacteriemia primaria causada por *Staphylococcus aureus*, infección de las vías urinarias por *Pseudomonas aeruginosa*, neumonía nosocomial por bacterias Gram positivas y negativas y la infección por herida quirúrgica. . (RUIZ, V., et al. 2005. pp. 10-16).

Tabla 7-1: Principales microorganismos causantes de infecciones nosocomiales.

NÚMERO DE PUESTO	NOMBRE DEL MICROORGANISMO
1	<i>Staphylococcus coagulasa-</i> negativos
2	<i>Staphylococcus aureus</i>
3	<i>Enterococcus spp</i>
4	<i>Candida spp</i>
5	<i>Escherichia coli</i>
6	<i>Klebsiella spp</i>
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
8	<i>Enterobacter spp</i>
9	<i>Serratia spp</i>
10	<i>Acinetobacter spp</i>

Fuente: (MURRAY, Patrick., et al. 2009)

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

1.2.4.1.5. Diagnóstico y Tratamiento

El diagnóstico se basa en la recepción, transporte y buen procesamiento de las muestras, de esto depende el éxito del tratamiento para que la persona sane. El tipo de muestra es según la zona de infección así tenemos:

- ❖ Muestras sanguíneas
- ❖ Muestra de vías respiratorias (altas, bajas)
- ❖ Muestra de heridas, abscesos, tejidos.
- ❖ Muestras de orina
- ❖ Muestras genitales
- ❖ Muestra de heces



Figura 8-1: Protocolo de identificación microbiana

Fuente: (MURRAY, Patrick., et al. 2009)

La parte final del protocolo de identificación, el antibiograma, es una guía de los antibióticos que afectan al microorganismo y que ayudarán a que el paciente sane, así los antibióticos actúan sobre algunos de los sistemas de la célula bacteriana como: Inhibición de la síntesis de la pared celular, inhibición de la síntesis de proteínas, inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos y otros antibióticos que actúan como antimetabolitos. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 195-204).

Los fármacos que inhiben la síntesis de la pared celular son los fármacos usados con mayor frecuencia y dentro de este grupo se encuentran los betalactámicos como las penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas y carbapenémicos. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 195-204).

La pared celular de las bacterias está formada por una capa de peptidoglicano y este es el resultado de la unión de ácido N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico mediante puentes peptídicos, formando así una capa rígida donde se encuentra una sustancia llamada PBP (proteína de unión a la penicilina) que ayuda a catalizar la formación de estos enlaces. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 195-204).

Los medicamentos betalactámicos presentan afinidad con las PBP y una vez unidas inhiben la formación de la pared celular debilitándola y activando la función de enzimas que degradan la pared celular. Pero la bacteria como sistema de supervivencia crea resistencias, evitando la interacción entre las PBP y los betalactámicos, modificando esta unión o hidrolizando los betalactámicos con enzimas β lactamasas. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 195-204).

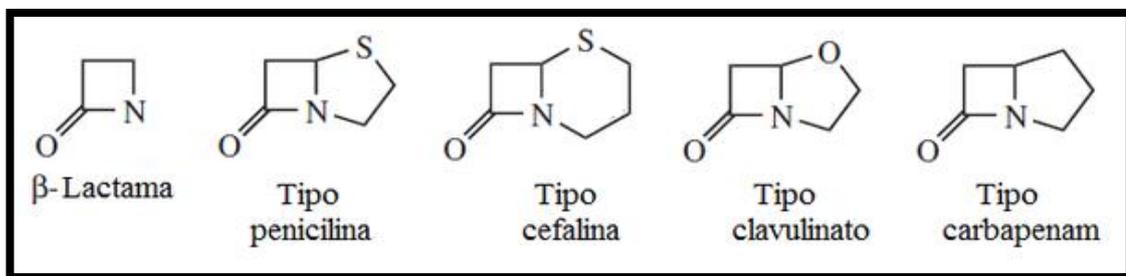


Figura 9-1: Estructura química de los β -lactámicos.

Fuente: (DELGADO, Antonio., et al. 2010).

Tabla 8-1: Principales medicamentos inhibidores de la pared celular con su respectivo mecanismo de acción.

ANTIBIÓTICOS	MECANISMO DE ACCIÓN
Penicilinas Cefalosporinas Cefamicinas Carbapenémicos	Unión a la PFP y enzimas responsables de la síntesis de peptidoglicanos
Inhibidor de la β -lactamasa/ β -lactámico	Unión a β -lactamasas y evita la inactivación enzimática del β -lactámico
Vancomicina	Inhibe la elongación de la cabeza de los peptidoglicanos
Daptomicina	Causa la despolarización de la membrana citoplasmática con la consiguiente interrupción de los gradientes de concentración iónica
Cicloserina	Inhibe la elongación de la cadena de peptidoglicanos.

Fuente: (MURRAY, Patrick., et al. 2009)

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015

Tabla 9-1: Listado de algunos fármacos pertenecientes el grupo de betalactámicos.

Penicilinas de amplio espectro	Ampicilina
	Amoxicilina
Penicilinas sensibles a las β -lactamasas	Bencilpenicilina
	Bencilpenicilina benzatínica
Penicilinas resistentes a las β -lactamasas	Oxacilina
	Dicloxacilina
Penicilinas combinadas	Ampicilina+sulbactman
	Amoxicilina+ ácido clavulánico
Otros betalactámicos	Cefalosporinas (cefalexina, cefazolina, ceftriaxona)
	Derivados del carbapenem (imipenem +cilastatina)

Fuente: (MURRAY, Patrick., et al. 2009)

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

Mientras que dentro de los fármacos que inhiben la síntesis de proteínas están: los aminoglucósidos, tetraciclinas, glicilciclinas, oxazolidionas, macrólidos y cetólidos. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 195-204).

Tabla 10-1: Espectro de actividad de medicamentos inhibidores de las síntesis de proteínas.

ANTIBIÓTICOS	ESPECTRO DE ACTIVIDAD
Aminoglucósidos	Utilizados para infecciones por bacilos Gram negativos.
Aminociclitol	Activa frente a <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .
Tetraciclinas	Antibiótico de amplio espectro activo frente a bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas.
Ciclicidina	Espectro similar a la de las Tetraciclinas pero más activa frente a las Gram negativas.
Oxazolidinonas	Activo frente a <i>Staphylococcus spp</i> incluidos cepas de SARM.
Macrólidos	Antibióticos de amplio espectro activos frente a bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas.
Cetólidos	Antibióticos con actividad similar a los macrólidos, activo frente algunos <i>Staphylococcus spp</i> y <i>Streptococcus spp</i> resistentes a los macrólidos
Lincosamidas	Activo frente a cocos Gram positivos
Estreptograminas	Activo frente a bacilos Gram positivos, buena actividad frente a <i>Staphylococcus spp</i> y <i>Streptococcus spp</i>

Fuente: (MURRAY, Patrick., et al. 2009)

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

Tabla 11-1: Listado de algunos fármacos inhibidores de las proteínas.

Macrólidos	Eritromicina
	Claritromicina
	Azitromicina
Aminoglucósidos	Gentamicina
	Amikacina
	Estreptomina
Tetraciclinas	Doxiciclina

Fuente: (MURRAY, Patrick., et al. 2009)

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

Dentro de los fármacos inhibidores de los ácido nucleicos se encuentran las quinolonas, que son antibióticos que inhiben las topoisomerasas tipo II y tipo IV, inhibiendo de esta manera la replicación, recombinación del ADN. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 195-204).

Tabla 12-1: Listado de fármacos del grupo de las quinolonas.

Levofloxacin	Fluoroquinolonas
Ciprofloxacina	

Fuente: (MURRAY, Patrick., et al. 2009)

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

Los fármacos denominados antimetabolitos son aquellos que impiden el proceso metabólico del ácido fólico (sustancia no sintetizada por el hombre), ya sea compitiendo por los sitios de unión o inhibiendo la síntesis de sustancias predecesoras. Dentro de este grupo encontramos: las sulfonamidas (sulfametoxazol+ trimetoprima). (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 195-204).

1.2.4.2 Hongos

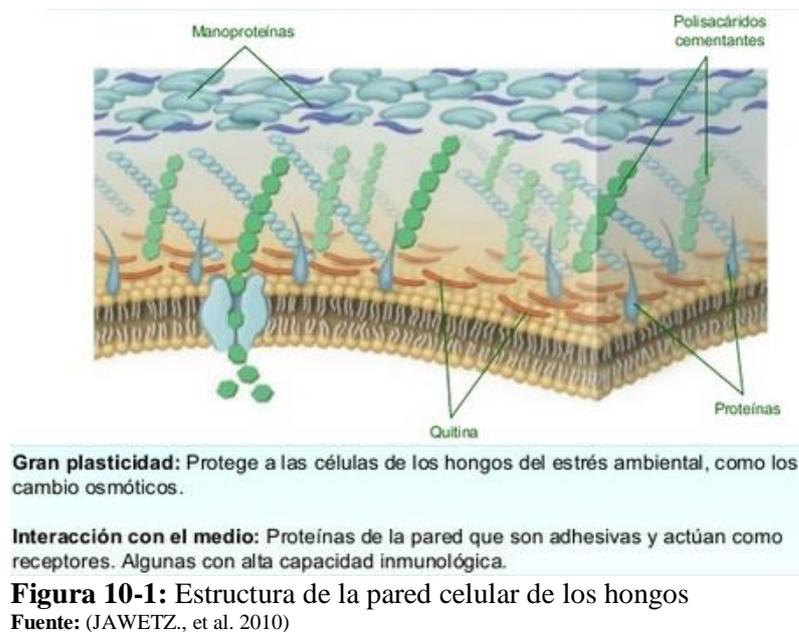
1.2.4.2.1. Definición

Son organismos vivos formados por células eucariotas que se encuentran en la degradación de materia orgánica, algunos llevan una vida heterotrófica (saprofíticos que sobreviven en materia muerta), otros son simbiontes (viven en asociación), mientras que otros son comensales (obtienen ventajas del huésped). Casi todos los hongos son aerobios, a excepción de algunos fermentadores que son anaerobios facultativos o estrictos. Estos organismos producen

metabolitos primarios como: ácido cítrico, alcohol, glicerol y metabolitos secundarios como: antibióticos. Son de crecimiento lento y su reproducción está dado por formación de esporas (sexual), o dada únicamente por mitosis (asexual). Ciertos hongos son agentes patógenos que afectan principalmente a personas inmunodeprimidas. (JAWETZ., et al. 2010. pp. 63-69).

1.2.4.2.2. Características estructurales

Los hongos son seres mucho más complejos que las bacterias, constituidos por células con pared celular rígida formada por quitina y glucano, mientras que su membrana celular sustituye el ergosterol por el colesterol, además cuentan con un núcleo bien definido, mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplasmático. (JAWETZ., et al. 2010. pp. 63-69).



1.2.4.2.3. Clasificación

Se puede clasificar de acuerdo a su morfología teniendo así: esporas y micelios. Las esporas son células que se reproducen por gemación, la célula madre se desprende de una parte de ella para formar a la célula hija, teniendo así las mismas características de la madre, mientras que las formas miceliales son células pluricelulares con estructura tubular por extensión apical, el conjunto de micelios se denomina hifas. (JAWETZ., et al. 2010. pp. 63-69).

Mientras que de acuerdo a su clasificación taxonómica se tiene a: cigomicetos, basidiomicetos, archiascomicetos, hemiascomicetos, euascomicetos.

Los cigomicetos son hongos miceliales con hifas y de importancia clínica ya que algunos hongos patógenos pertenecen a este grupo, los basidiomicetos son hongos con forma filamentosa, los archiascomicetos se desarrollan en forma trófica vegetativa y son de reproducción asexual por fisión binaria, los hemiascomicetos son levaduras vegetativas que se reproducen por gemación, a diferencia de los euascomicetos que se reproducen sexualmente. (JAWETZ., et al. 2010. pp. 63-69).

Una vez que el hombre es afectado por un hongo patógeno se produce una micosis, la cual también tiene una clasificación de acuerdo a la zona de infección. Así tenemos: superficiales, cutáneas, subcutáneas, endémicas y oportunistas. (JAWETZ., et al. 2010. pp. 63-69).

Las micosis superficiales no son destructivas y afectan a la capa de queratina de la piel y cabello, a diferencia de las micosis cutáneas que a más de afectar a la capa queratinizada de la piel, cabello y uñas, produce ya una respuesta inmunitaria, las micosis subcutáneas son mucho más profundas y llegan a zonas de la córnea, músculo y tejido por traumatismos, finalmente las micosis oportunistas son ocasionadas por hongos comensales en su gran mayoría del género *Candida*. (JAWETZ., et al. 2010. pp. 63-69).

Tabla 13-1: Listado de hongos causantes de diferentes micosis.

MICOSIS SUPERFICIALES	MICOSIS CUTÁNEAS Y SUBCUTÁNEAS	MICOSIS ENDÉMICAS	MICOSIS OPORTUNISTAS
Piedra negra <i>Piedraia hortae</i>	Dermatofitosis Género <i>Microsporum</i> Género <i>Trichophyton</i>	Blastomicosis <i>Blastomyces dermatitidis</i>	Aspergillosis <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus niger</i>
Piedra blanca Género <i>Trichospora</i>	Onicomycosis Género <i>Candida</i> Género <i>Aspergillus</i>		Candidiasis <i>Candida albicans</i> <i>Candida tropicalis</i>
			Criptococosis
			Tricosporonosis
			Cigemicosis

Fuente: (JAWETZ., et al. 2010)

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

1.2.4.2.4. Enfermedades micóticas más comunes en el Ecuador.

En el Ecuador las infecciones micóticas de mayor frecuencia son las Candidiasis orales, vaginales, esofágicas y las nosocomiales, aunque en menor número hay personas afectadas por micosis cutáneas ocasionadas por Dermatofitos.

Las candidiasis orales se caracterizan por la presencia de manchas blancas o rojas a nivel bucal, además de ardor, en tanto que las candidiasis vaginales causan enrojecimiento alrededor de la vagina y la producción de una secreción blanquecina de mal olor que provoca picazón y un poco de ardor, los pacientes inmunodeprimidos son blanco de estos microorganismos oportunistas, especialmente los pacientes de VIH , muchos de ellos pueden sufrir de Candidiasis esofágica que no es muy común y poco visible a simple vista.

1.2.4.2.5. Tratamiento

Los medicamentos antifúngicos han tenido una amplia evolución, en un principio solo se utilizaban Anfotericina B o Fluorocitosina, las cuales resultaban muy tóxicas para la salud, ahora gracias a la tecnología farmacéutica se ha conseguido la innovación de antifúngicos con mayor efecto y menos toxicidad. Así tenemos a: alilaminas, antimetabolitos, imidazoles, triazoles, equinocandinas, polienos y otros. (JAWETZ., et al. 2010. pp. 83-89).

Tabla 14-1: Lista de antifúngicos con su respectivo mecanismo de acción.

TIPO DE ANTIFUNGICO	MEDICAMENTO	MECANISMO DE ACCION
Alilaminas	Terbinafina	Inhibe escualeno epoxicasa
Antimetabolitos	Flucitosina	Inhibe la síntesis de ADN
Imidazoles	Ketoconazol, clotrimazol, sulconazol	Inhibe las enzimas lanosterol dependientes P-450
Triazoles	Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Ravuconazol	Inhiben las enzimas de lanosterol dependientes P-450
Equinocandinas	Aminocandina	Inhibe la síntesis de glucanos
Polienos	Anfotericina B	Unión al ergosterol y provoca estrés oxidativo.
Inhibidores de la síntesis de quitina	Nikomicina Z	Inhibe la síntesis de la quitina

Fuente: (JAWETZ., et al. 2010)

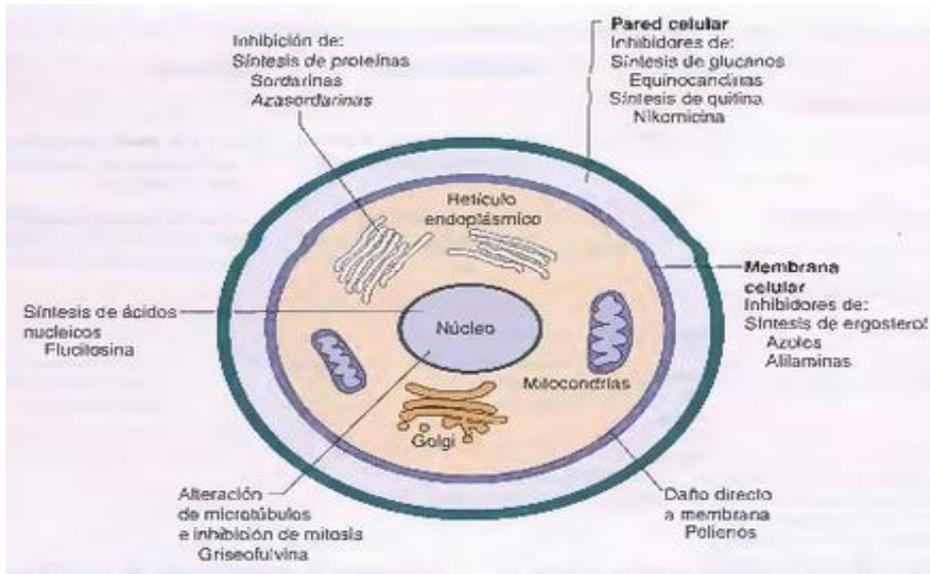


Figura 11-1: Lugar de acción de los antifúngicos
Fuente: (JAWETZ., et al. 2010)

1.3. Cepas microbianas en estudio

Fueron seis cepas microbianas en estudio: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*.

1.3.1. *Staphylococcus aureus*

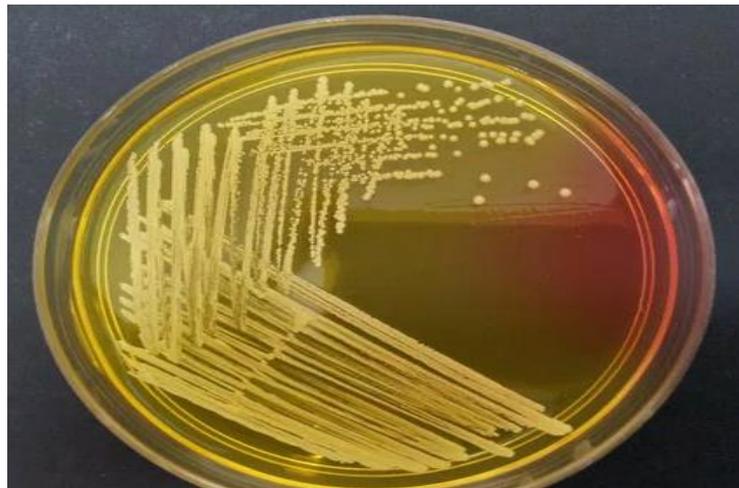


Figura 12-1: Vista macroscópica *Staphylococcus aureus*
Fuente: (MURRAY, Patrick., et al. 2009).



Figura 13-1: Vista microscópica *Staphylococcus aureus*
Fuente: (MURRAY, Patrick., et al. 2009).

1.3.1.1. Morfología, virulencia y enfermedad

Bacterias anaerobias, cocos Gram positivos con asociación en racimos irregulares, catalasa positivos, esta cepa bacteriana se caracteriza porque contiene proteína A y ácido teicoico con residuos de N-acetilglucosamina. Dentro de su estructura posee factores de virulencia que ayudan a la adherencia de estos agentes a los tejidos del huésped, evitando así el proceso de fagocitosis y la acción de enzimas hidrolíticas.

Staphylococcus aureus produce enfermedades mediadas por las toxinas que segrega así tenemos: intoxicaciones alimentarias, infecciones cutáneas, bacteriemia, endocarditis, neumonía, además de infecciones nosocomiales. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 205-206).

1.3.1.2. Epidemiología

Esta cepa forma parte de la flora normal de la piel y mucosas, debido a la gruesa capa de peptidoglicano que poseen la Gram positivas puede soportar durante largos periodos de tiempo en superficies secas. La forma de contagio puede ser directa o indirecta, siendo un factor de riesgo la presencia de cuerpos extraños y el empleo de antibióticos que debiliten la flora bacteriana normal.

Las infecciones por SARM (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina) van en aumento, en décadas anteriores se creía que solo afectaba a personas hospitalizadas con el sistema inmune debilitado, pero hoy se ha comprobado que personas que no han estado expuestas a factores de

riesgo también lo padecen, produciendo un gasto extra al sector hospitalario. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 206-207).

1.3.1.3. Condiciones de crecimiento

Las cepas de *Staphylococcus aureus* crecen a 37°C en medios de cultivo como: agar sangre, agares nutritivos (agar soya tripticasa, BHI), agar sal y manitol y caldos nutritivos. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. p. 207).

1.3.2. *Escherichia coli*



Figura 14-1: *Escherichia coli*.
Fuente: (MURRAY, Patrick., et al. 2009).

1.3.2.1. Morfología, virulencia y enfermedad

Bacterias anaerobias facultativas, en forma de bacilos Gram negativos, son catalasa positivos, oxidasa negativos, fermentadores de glucosa y lactosa con segregación de CO₂, reductores de nitratos y productores de vitamina B y K. Su tamaño fluctúa entre 0.5-3µm, no son bacterias formadoras de esporas, pero los flagelos son parte de su estructura, los mismos que ayudan a su movilización. La característica morfológica macroscópica más representativa es el color verde metálico de sus colonias en agar E.M.B. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 295-298).

Estudios han expuesto la existencia de 5 clonas de *Escherichia coli* siendo estas: ETEC, EIEC, EAEC, EHEC, EPEC. La EPEC y la EAEC son causantes de diarreas secretoras asociadas con fiebre, la EIEC afecta a la mucosa del colon, la EHEC causa colitis hemorrágica, mientras la

ETEC es causante de diarrea en niños menores de 5 años. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 295-298).

1.3.2.2. Epidemiología

Son propias del tubo digestivo, encontrándose especialmente en el colon, las infecciones que provoca son en general de tipo endógenas, a excepción de la gastroenteritis. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 295-298).

1.3.2.3. Condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas de *Escherichia coli* pueden crecer en agar sangre, agar MacConkey y Agar E.M.B. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 295-298).

1.3.3. Klebsiella pneumoniae

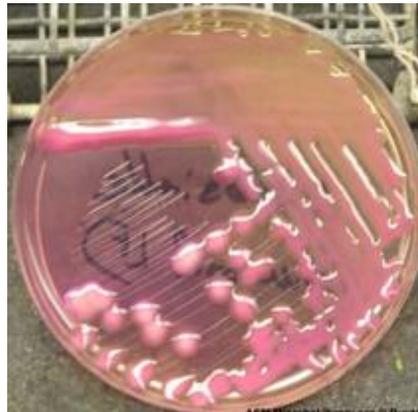


Figura 15-1: *Klebsiella pneumoniae*
Fuente: (MURRAY, Patrick., et al. 2009).

1.3.3.1. Morfología, virulencia y enfermedad

Bacteria anaerobia facultativa Gram negativa, de un tamaño que va alrededor de 0.2-0.5 μ m. *Klebsiella pneumoniae* está rodeada por una cápsula, que le da un aspecto mucoso a las colonias que son grandes, brillantes y de color rosa.

Esta bacteria es la causante de infecciones urinarias, infecciones de heridas y neumonía. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. p. 305).

1.3.3.2. Epidemiología

Klebsiella pneumoniae se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente, de forma específica en las mucosas de animales mamíferos y en la nasofaringe y tracto gastrointestinal del hombre. En pacientes hospitalizados la tasa de colonización se encuentra triplicada, y tiene una relación proporcional frente al tiempo de hospitalización. (ECHEVERRI, Lina., et al. 2010. pp. 34-36)

1.3.3.3. Condiciones de crecimiento

Crecen a 37°C en agar MacConkey. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. p. 305).

1.3.4. *Proteus mirabilis*

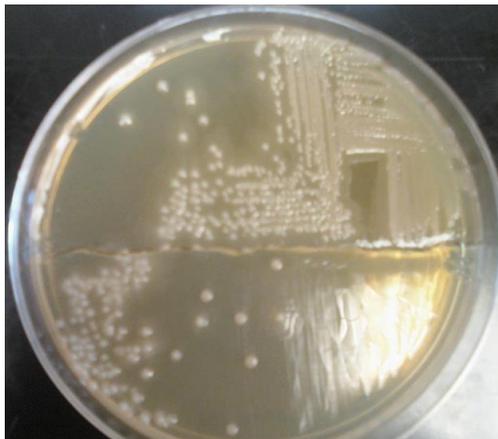


Figura 16-1: *Proteus mirabilis*
Fuente: (MURRAY, Patrick., et al. 2009).

1.3.4.1. Morfología, virulencia y enfermedad

Bacteria Gram negativa anaerobia facultativa, que presenta la formación de colonias redondeadas y blanquecinas, con resultados de aglutinación y ureasa positiva, siendo la razón por la que la excesiva producción de amoniaco alcaliniza la orina. *Proteus mirabilis* es la causante principal de infecciones urinarias, bacteriemias e infección en heridas. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. p. 305).

1.3.4.2. Condiciones de crecimiento

Proteus mirabilis crece a 37° en agar nutritivo o agar MacConkey.

1.3.5. *Pseudomonas aeruginosa*



Figura 17-1: Vista microscópica de *Pseudomonas aeruginosa*
Fuente: (MURRAY, Patrick., et al. 2009).



Figura 18-1: Vista macroscópica de *Pseudomonas aeruginosa*
Fuente: (MURRAY, Patrick., et al. 2009).

1.3.5.1. Morfología, virulencia y enfermedad

Bacteria aerobia estricta flagelada, en forma de bacilos Gram negativos y oxidadores de glucosa, de pequeño tamaño (0.5-5µm) que generalmente se encuentran en pareja.

Como parte de su estructura está una cápsula mucoide (constituida de polisacáridos), adhesinas y la generación de toxinas y enzimas como: exotoxina, piocianina y fosfolipasa C. *Pseudomonas aeruginosa* es la causante de enfermedades respiratorias, infecciones urinarias, infecciones a nivel de tejidos blandos, ojos, oídos y piel. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 323-324).

Tabla 15-1: Funciones de algunos de los componentes estructurales de *Pseudomonas aeruginosa*.

COMPONENTES ESTRUCTURALES	FUNCIONES
Pili	Facilita la adherencia de la bacteria a los tejidos del huésped.
Cápsula	Facilita la adherencia de la bacteria a los tejidos del huésped evitando la fagocitosis y atenuando la acción de los neutrófilos y linfocitos.
Lipopolisacáridos	Acción endotoxina
Piocianina	Ayuda a la alteración de los cilios.

Fuente: (MURRAY, Patrick., et al. 2009).

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

1.3.5.2. Epidemiología

Esta bacteria se desarrolla en los ambientes húmedos de los hospitales como: lavabos, cuartos de baño, respiradores, incluso en equipos de diálisis y de manera transitoria puede colonizar también el tracto respiratorio y digestivo de pacientes con larga estadía de hospitalización. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 323-324).

1.3.5.3. Condiciones de crecimiento

Debido a sus exigencias nutricionales sencillas estas bacterias crecen a una temperatura de 37°C aproximadamente en agar sangre o MacConkey. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 323-324).

1.3.6. *Candida albicans*



Figura 19-1: Vista microscópica *Candida albicans*
Fuente: (MURRAY, Patrick., et al. 2009).

1.3.6.1. *Morfología, virulencia y enfermedad*

Son hongos de células levaduriformes de pequeño tamaño (3-5 μm) pero formadoras de hifas y pseudohifas que pertenecen al grupo de hongos patógenos oportunistas, siendo la cuarta causa de infecciones a nivel hospitalario.

Macroscópicamente sus colonias lisas son de color blanco cremoso aunque esto puede variar por la presencia de células levaduriformes sujetas a gemación modificando el fenotipo de las colonias haciéndolas vellosas.

Este hongo es el causante de infecciones vaginales, cutáneas y bucales. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 710-711).

1.3.6.2. *Epidemiología*

Este cepa se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza: agua, suelo, aire y también en el ser humano colonizando principalmente el tracto digestivo (boca-recto), el tejido vaginal, la piel, la uretra y debajo de las uñas, como parte de su flora normal, por ello la mayoría de las infecciones causadas son de tipo endógeno, cuando las defensas de cuerpo se debilitan este microorganismo aprovecha y causa infección. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. pp. 711-712).

1.3.6.3. Condiciones de crecimiento

Las cepas de *Candida albicans* pueden desarrollarse sobre agar Sabouraud con cloranfenicol a una temperatura de 37°C o 28°C. (MURRAY, Patrick., et al. 2009. p. 712).

1.4. Hemaglutinación

Formación de partículas entrelazadas que se fundamentan en una reacción inmunológica antígeno-anticuerpo. Esta reacción se da en dos fases: fase de sensibilización y fase de aglutinación, en la primera el antígeno y anticuerpo tienen su primer contacto y en la segunda se da la reacción en donde se forma el agregado celular y se presenta la aglutinación. La unión antígeno-anticuerpo está dada por atracciones intermoleculares como: Uniones hidrófobas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals.

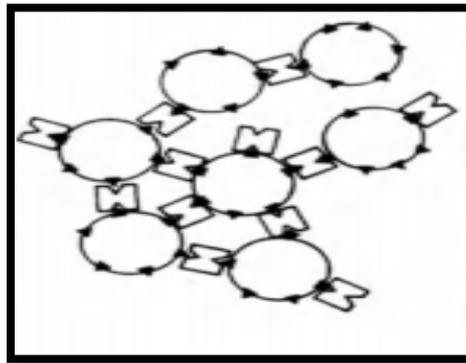


Figura 20-1: Reacción de aglutinación
Fuente: (SHINITI, Celso. 2007).

El fenómeno de aglutinación es una reacción que puede darse no solo en glóbulos rojos, sino también en glóbulos blancos y plaquetas, con antígenos que circulan en el torrente sanguíneo como bacterias y lectinas alimentarias.

1.4.1. Lectinas

Herrman Sill en el año de 1888 descubrió la hemoaglutinación en semillas de ricino, y esta se debía a un factor proteico aglutinante llamado ricina, pero no era la única semilla que presentaba este factor, las semillas de *Abrus precatorius* tenían abrina, proteína que presentaba igual acción, de ahí nació el término “hemoaglutininas”, hasta que en el año de 1907 en *Phaseolus vulgaris* Boyd y R.M. Reguera descubrieron que esta tenía aglutininas específicas para

eritrocitos de grupos sanguíneos denominándolas ahora con el nombre de “lectinas”. (SHINITI, Celso. 2007. p. 7).

1.4.1.1. Definición

Grupo de proteínas de tipo no inmune que se caracteriza por su unión específica y reversible a carbohidratos libres o a los que se encuentran formando parte de estructuras complejas. Las lectinas presentan dos sitios de unión: a una molécula glicosilada, y un azúcar específico, la característica principal de esta reacción es aglutinar a la célula con la que se unen. Las aglutininas no solo se encuentran en animales o vegetales, se han reportado lectinas en: bacterias, hongos, algas y líquenes. (CASTILLO, Adriana., et al. 2005. pp. 55-56).

1.4.1.2. Características

Para que una proteína se incluya dentro de este grupo debe cumplir los siguientes detalles:

- ❖ Poseen un sitio de unión específico a carbohidratos.
- ❖ No son inmunoglobulinas.
- ❖ No producen modificaciones a las sustancias a las que se unen.

Con estas premisas se excluye a los taninos, sustancias lipídicas y otras que también producen aglutinación, además las lectinas no son de origen inmunológico, su estructura es totalmente distinta a la de los anticuerpos. (SHINITI, Celso. 2007. pp. 8-10).

1.4.1.3. Tipo de lectinas

Existen tres tipos de lectinas:

- ❖ Merolectinas: Poseen un solo sitio de unión a carbohidratos y no aglutina a la célula a que se une.
- ❖ Hololectina: Poseen dos sitios de unión y aglutinan a la célula a la que se unen.
- ❖ Quimerolectina: Pueden o no aglutinar, poseen un sitio de unión específico a carbohidratos y otro a otros componentes. (SHINITI, Celso. 2007. p. 11).

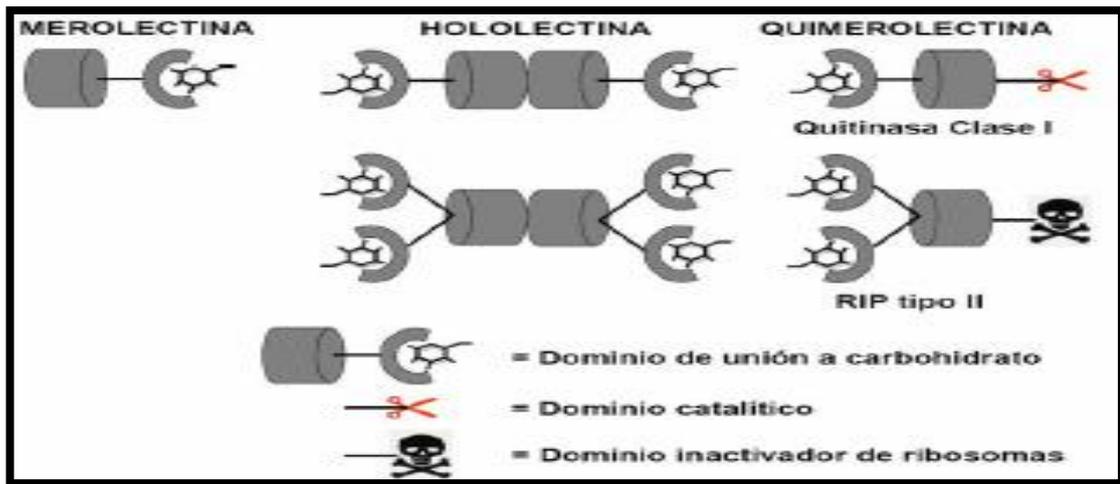


Figura 21-1: Representación esquemática de los tres tipos de lectinas.
Fuente: (SHINITI, Celso. 2007).

1.4.1.4. Aplicaciones

Debido a su selectividad y su fácil purificación las lectinas pueden utilizarse para:

Purificar glicolípidos, glicoproteínas y glucanos mediante la técnica de cromatografía por afinidad, incluso puede utilizarse como marcadores fluorescentes en técnicas histoquímicas o como detección de transformaciones malignas, específicamente las lectinas de *Vicia villosa* reconoce el antígeno Tn exclusivo para células tumorales, las lectinas puede utilizarse también como tratamiento anticancerígeno ya que son sustancias inactivadoras de ribosomas, o como antiretroviral ya que inhiben la entrada del virus a la célula del huésped por la unión lectina-glicoproteína gp120. (SHINITI, Celso. 2007. pp. 12-13).

1.4.1.5. Utilidad terapéutica frente al cáncer

Los glicoconjugados son importantes por su papel en el reconocimiento, comunicación y adhesión celular, estas actividades son igual de importantes en la formación del tumor, su progresión y la metástasis, durante este proceso los oligosacáridos de glicoproteínas de la superficie de células cancerígenas están alteradas y esta alteración puede ser divisada por lectinas.

Varios estudios *in vitro* e *in vivo* se han desarrollado, en donde queda claro el efecto inhibitorio del crecimiento del tumor, las investigaciones prueban que las lectinas inhiben la síntesis del

DNA, RNA y proteínas, aunque aún no se ha comprobado si el efecto es directo o indirecto. (CASTILLO, Adriana., et al. 2005. pp. 56-61).

Tabla 16-1: Estudios *in vivo* de lectinas y efectos sobre el cáncer.

Lectina	Mecanismo de acción	Tipo	Ref.
PHA (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Inhibición del crecimiento de tumores	Murina linfomas ascíticos	25
SBA (<i>Glycine max</i>)	Fortalecimiento del sistema inmune del huésped	Murina linfoma ascítico	27
TMA I y II (<i>Triholoma mongolicum</i>)	Inhibición del tumor y prolongación de la vida de los animales	Ratón con células de sarcoma 180	28
GS-1 (<i>Griffonia simplicifolia</i>)	Inhibición del crecimiento de tumor	Ratón con células ascíticas Ehrlich	23,24
VCA(<i>Viscum album, L coloratum</i>)	Inhibición del crecimiento de tumores y metástasis por el incremento de la apoptosis y la inhibición de la angiogénesis	Ratón inoculado con células de melanoma B16-BL6	48
KML-C (Korean mistletoe; <i>Viscum album coloratum</i>)	Actividad inmunomoduladora para fortalecer el sistema de defensa del huésped, efecto en metástasis asociado a muerte natural y macrófagos	Murina melanoma, carcinoma de colon y linfoma	54
ML-I (<i>Viscum album</i>)	Efecto antitumoral con reducción del crecimiento del linfoma trasplantado	Ratón con tumores de linfoma no-Hodgkin	55

Fuente: (CASTILLO, Adriana., et al. 2005)

A pesar del gran aporte de las lectinas para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer, éstas también son consideradas como sustancias tóxicas, ya que son sustancias RIP II, sustancias inhibidoras de ribosomas, en cuya estructura presentan dos cadenas peptídicas, la una que se une con glucoproteínas y la otra que inactiva al ribosoma, además que tras su ingesta el animal o humano presenta parenquimatositis, presencia de coágulos y hemorragias, además de la pérdida de absorción de nutrientes, ya que las lectinas al unirse con las glicoproteínas de las células presentes en la mucosa digestiva impiden esta función. (CASTILLO, Adriana., et al. 2005. pp. 56-61).

1.5. Fitoterapia

1.5.1. Definición

Ciencia que se basa en el conocimiento ancestral y uso de productos naturales como tratamiento preventivo o curativo de enfermedades. Se entiende como planta medicinal a aquella planta que presenta una parte activa en su estructura, dicha parte activa (hojas, flores, raíz, corteza) es la que dará el efecto farmacológico. (VANACLOCHA, Bernat., et al. 2003. pp. 29-31).

La fitoterapia centra su estudio en el efecto farmacológico de los principios activos de las plantas, en general el principio activo constituye el 1% del peso en seco del vegetal, pero puede ser uno o varios principios activos los que generan la actividad, pues pueden trabajar sinérgicamente. (VANACLOCHA, Bernat., et al. 2003. pp. 29-31).

La fitoterapia hace uso de fitomedicamentos, medicamentos a base de principios activos extraídos de fuentes vegetales, cuya concentración está estandarizada, además de que su efectividad está basada en evidencia dando seguridad a quien los adquiera. (VANACLOCHA, Bernat., et al. 2003. pp. 29-31).

1.5.2. Métodos de extracción de componentes

La extracción es la separación del principio activo del resto de componentes del vegetal. Para extraer los principios activos de las células se necesita un método físico o el empleo de solventes haciendo uso del fenómeno de difusión, fenómeno que está mediado por la ley de Fick, así los componentes activos inmersos en la célula migrarán al solvente de extracción. (MARCANO, Deanna., et al. 2002. pp. 60-62).



Figura 22-1: Métodos de extracción

Fuente: (MARCANO, Deanna., et al. 2002).

La extracción mecánica por expresión es la obtención de los principios activos de la planta por presión, mientras que el método de incisiones es más para extracción de: gomas y resinas, así a la planta se le realiza una serie de incisiones que permiten la salida de estas sustancias. La destilación por arrastre de vapor permite la extracción de aceites esenciales, al material vegetal se le añade cierta cantidad de agua y se destila. (MARCANO, Deanna., et al. 2002. pp. 60-62).

La extracción con disolventes se basa en el buen uso de solventes de extracción, estos deben ser afines con la naturaleza del principio activo que se deseen obtener, en este tipo de extracciones hay factores que controlar como: temperatura y tiempo de extracción. La temperatura puede acelerar el tiempo de extracción, pero también puede degradar ciertos componentes, mientras que el tiempo de extracción dependerá del tipo de droga con la que se trabaje. Dentro de la extracción con disolventes se tiene a: las extracciones continuas y discontinuas. Siendo las discontinuas aquellas en donde el material vegetal es sumergido totalmente en el solvente de extracción y los componentes inmersos en las células migran al disolvente hasta alcanzar el equilibrio, así se tiene a la maceración, en donde el vegetal triturado es puesto en contacto con un volumen de solvente que sobrepase la cantidad total del vegetal, es sellado herméticamente durante 14 días y al término de este tiempo se filtra y se obtiene un extracto fluido. (MARCANO, Deanna., et al. 2002. pp. 60-62).

En la extracción continua el solvente de extracción arrastra los principios activos, así por ejemplo la extracción con Soxhlet asegura que durante todo el tiempo de extracción el disolvente puro arrastre los principios activos de vegetal, mientras que en la extracción con reflujo y calor, cierta parte del disolvente se evapora y sube hasta el refrigerante, este se condensa por la acción del agua fría que circula por la parte exterior, depositándose nuevamente el solvente al matraz. (MARCANO, Deanna., et al. 2002. pp. 60-62).

1.6. *Parmelina tiliacea*

1.6.1. *Líquenes*

Son seres estables, autosuficientes que provienen de la asociación simbiótica entre un hongo (micobionte) y un alga (fotobionte), siendo el hongo quien domina la asociación, hongos del género *Ascomycota* y *Basidiomycota*. (RANKOVIC, Branislav. 2015. p. 1).

Cada miembro aporta con una acción distinta, en donde el alga es el responsable de realizar la fotosíntesis y sintetizar nutrientes orgánicos a partir de CO₂, mientras que el hongo protege al alga de la intensidad de la luz y la desecación. (RANKOVIC, Branislav. 2015. p. 3).

Se cree que los líquenes son los primeros colonizadores de hábitats terrestres, su distribución va desde las llanuras más altas tropicales al ártico, bajo condiciones acuáticas, poblando rocas, árboles, desiertos, incluso se han hallado restos de líquenes en las superficie de los caparzones de las tortugas de las Islas Galápagos, para Douglas Larron el 8% del planeta Tierra está

poblado por líquenes, encontrándose en mayor número en las zonas más húmedas, cabe recalcar que estos seres son difíciles de adaptarse en hábitats no nativos, aunque soportan variaciones de temperatura, presión y sequía. (YOUSUF, Sammer., et al. 2014. pp. 222-225).

Aunque su crecimiento es lento medido en mm, su vida es larga, aún en condiciones extremas, los líquenes son utilizados en la industria farmacéutica, cosmética, alimentaria incluso como indicadores de contaminación. (RANKOVIC, Branislav. 2015. pp. 2-3).

Estos seres vivos sintetizan una variedad de metabolitos secundarios, la mayoría a partir del metabolismo de hongos. (RANKOVIC, Branislav. 2015. pp. 5-6).

1.6.2. Descripción botánica

Parmelina tiliacea, es un liquen tipo folioso, cuyos lóbulos son adheridos al sustrato, poseen un talo de 5-7 cm, sus lóbulos de aspecto redondeado con orientación hacia adentro presentan 6-11 mm de ancho, son adyacentes y en algunas ocasiones se presentan de tipo solapantes.

La cara superior es de color gris con tonalidades blanquecinas, mientras que la cara inferior unida al sustrato es de color oscuro, en ocasiones se pueden visualizar ricinas en las orillas de los lóbulos. Los apotecios se registran en medidas de hasta de 6 mm, en ocasiones aún más grandes. (PERRY, B., et al. 1999. p. 4).

1.6.3. Taxonomía

Tabla 17-1: Taxonomía *Parmelina tiliacea*.

DOMINIO	Eucariota
REINO	Fungi
FILUM	Ascomycota
CLASE	Lecanoromycetes
ORDEN	Lecanorales
FAMILIA	Parmeliaceae
GENERO	<i>Parmelina</i>
ESPECIE	<i>Parmelina tiliacea</i>

Fuente: (BOLUDA, 2006)
Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

1.6.4. Composición química

Los líquenes de *Parmelina tiliacea* están constituidos por metabolitos primarios como: proteínas, aminoácidos, carotenoides, polisacáridos, vitaminas. En su gran mayoría de tipo hidrosolubles.

Tabla 18-1: Porcentaje de metabolitos primarios de *Parmelina tiliacea*.

Aminoácidos	2-11%
Carotenoides (β caroteno, luteína)	2-23 mg
Polisacáridos	4-5%
Vitaminas (ácido ascórbico)	(no se especifica porcentaje)

Fuente: (RANKOVIC, Branislav. 2015)

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

1.6.5. Composición fitoquímica

Los metabolitos secundarios presentes en este líquen son de origen fúngico y constituyen el 0.1-10% del peso seco que en ocasiones alcanza hasta el 30%, hasta Junio del 2012 se han hallado 1050 sustancias líquénicas, todas de naturaleza poco soluble. (YOUSUF, Sammer., et al. 2014. pp. 226-232).

En su gran mayoría *Parmelina tiliacea* está constituida de compuestos fenólicos así se tiene:

Tabla 19-1: Composición fitoquímica *Parmelina tiliacea*.

GRUPO	COMPUESTOS
Fenoles mononucleares	Oreinol, orcinol.
Quinonas	Parietina
Dibenzofuranos	Ácido panárico
Depsidones	Ácido Salazínico
Depsones	Ácido picrolíquénico
Depsides	Ácido homosekikaico
G-lactonas	Ácido protoliquesterínico
Xantonas	Diquexantona

Fuente: (YOUSUF, Sammer., et al. 2014)

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

Se ha reportado un compuesto depsipéptido cíclico presente únicamente en la *Artogalina* una especie endémica de las Islas Galápagos.

Estos metabolitos secundarios son el producto de tres rutas biosintéticas que siguen los líquenes y son: vía del ácido Shikímico (generación de ácido pulvínico y derivados fenólicos cíclicos), vía del polymalonato (generación de hyperhomosekikaico, depsidones), y vía del ácido mevalónico (generación de di-triterpenos compuestos muy poco comunes en los líquenes). (YOUSUF, Sammer., et al. 2014. pp. 226-232).

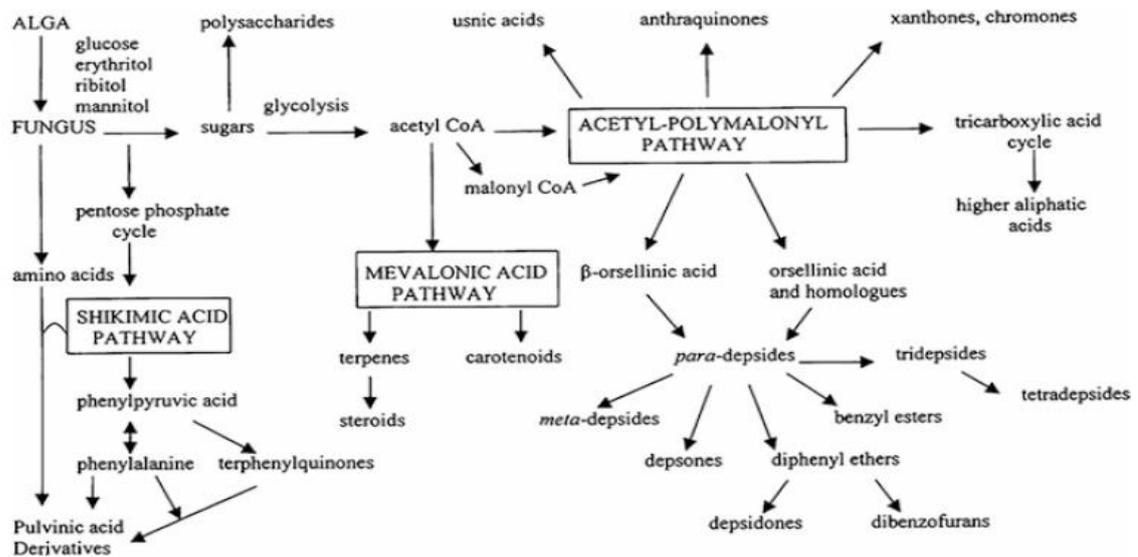


Figura 23-1: Rutas metabólicas de los metabolitos secundarios del líquen
Fuente: (YOUSUF, Sammer., et al. 2014).

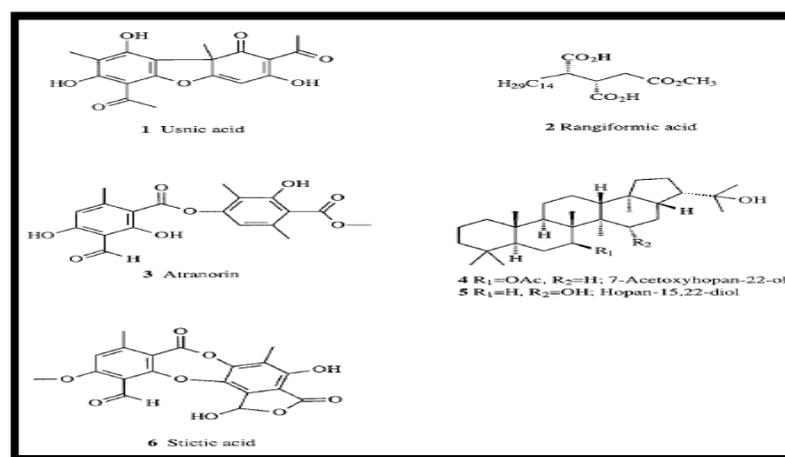


Figura 24-1: Metabolitos secundarios presentes en *Parmelina spp*
Fuente: (NEDELJKO., et al. 2012).

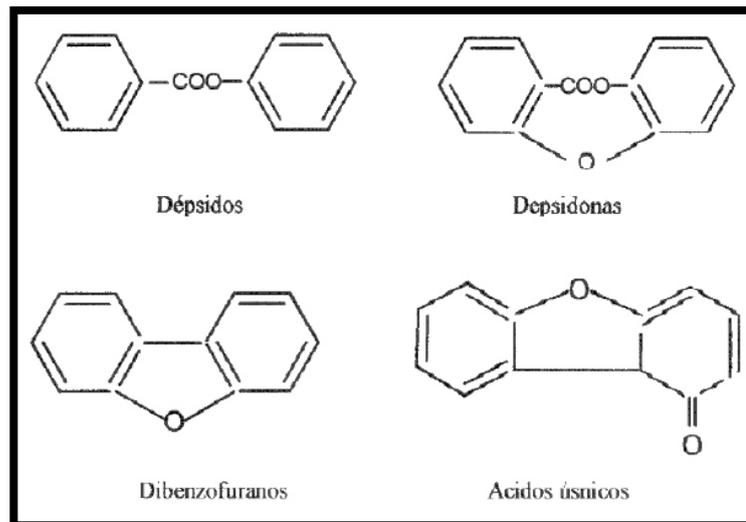


Figura 25-1: Estructura base de algunas sustancias líquénicas.
 Fuente: (CÓNDOR., et al. 2012).

Además investigaciones concluyen que la concentración de metabolitos secundarios puede estar mediado por factores como: la altura, el clima, la humedad y la exposición del líquen a los rayos UV-B, donde una posible sobreexposición podrían generar mayor producción de enzimas degradativas, además de que la composición metabólica variará de una especie a otra, así por ejemplo la *Xanthoparmelia*, *Parmelina*, *Neofuscelia*, tres géneros de líquen estructuralmente parecidos difieren en su composición, encontrándose únicamente el ácido úsnico en la corteza del género *Xanthoparmelia*, mientras en la *Parmelina*, se halló atranorina en su corteza y en la *Neofuscelia* ninguno de estos componentes. (YOUSUF, Sammer., et al. 2014. pp. 226-232).

1.6.6. Utilidad terapéutica

El uso de líquenes en la medicina se basa en el hecho de que contienen sustancias biológicamente activas, se piensa que sus funciones se deben a respuestas a factores ambientales. Ejercen una amplia variedad de acciones biológicas incluyendo: antioxidante, antiinflamatorio, antiproliferativo, antibacterial, antifúngico, citotóxico y antitumoral. Para *Vartia* el potencial antibacteriano depende mucho de la especie de líquen, del disolvente utilizado durante la extracción de componentes y las cepas bacterianas. (YOUSUF, Sammer., et al. 2014. pp. 236-240).

Especialmente el género *Parmelia* ha sido utilizada para tratar infecciones diarreicas, enfermedades de la piel, pie de atleta, Candidiasis, y en Alemania incluso hay un

medicamento para el resfriado llamado Broncholind de la casa comercial McMklosterfrau. (YOUSUF, Sammer., et al. 2014. pp. 236-240).

Tabla 20-1: Compuestos liquénicos y sus efectos terapéuticos.

COMPUESTOS LIQUENICOS	ACCIONES
Atranorina	Antimicrobial, antioxidante, antiinflamatorio, anticáncer.
Acido protocetrárico	Antifúngico, antibacterial, antioxidante, anticáncer.
Acido úsnico	Antiviral, antitumoral, antioxidante, antibacterial, analgésico.
Acido homosekikaico	Antioxidante, antibacterial.

Fuente: (RANKOVIC, Branislav. 2015)

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Muestras liquenáceas

2.1.1. Recolección

Las muestras del líquen *Parmelina tiliacea* fueron recolectadas en la zona andina de San Miguel perteneciente a la provincia de Bolívar, en las coordenadas geográficas S01° 43' 51.139''W 079° 3' 4.402'' Altitud: 2714 m, en Junio del 2015.

2.1.2. Acondicionamiento

Las muestras de *Parmelina tiliacea* recolectadas cumplieron con los procesos de: selección, lavado, secado y molienda, tratando de mantener la genuinidad y propiedades que a ella se le atribuyen.

Se seleccionaron así a los líquenes en mejor estado morfológico, descartando restos de cortezas y material vegetal de otra procedencia, ya que *Parmelina tiliacea* al ser un líquen tipo folioso sus lóbulos se encuentran débilmente unidos a sus sustratos. (ROSENTERER, Roger, et al. 2007. p.7).

El lavado se realizó únicamente con agua potable, tratando de eliminar la mayor cantidad posible de tierra, sin llegar a estropear a la muestra, la cual se llevó a sequedad en una estufa (San Jod mod. SE33A) a temperatura de 40°C por 5 días, finalmente los líquenes secos son triturados en un molino (100 W).

2.1.3. Control de calidad

2.1.3.1. Determinación de cenizas totales

El líquen (2 g) seco y triturado se colocó en un crisol previamente tarado, la muestra se carbonizó en un reverbero y posteriormente se incineró en una mufla a una temperatura de

650°C por dos horas, al término del tiempo la muestra liquenácea contenida en el crisol se enfrió en el desecador y se pesó, reincidiendo este proceso hasta obtener un peso constante ($\pm 0.5\text{mg/g}$). Este ensayo se realizó por duplicado.

$$C = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

Figura 1-2: Fórmula de cenizas totales

Fuente: (VIDAURRE, Milagros., et al. 2010).

Donde C es el contenido de cenizas totales, M la masa del crisol tarado y vacío, M1 masa del crisol con la muestra liquenácea, M2 masa del crisol con la ceniza de la muestra liquenácea y 100 es el factor. (VIDAURRE, Milagros., et al. 2010, pp. 122-125).

2.1.3.2. Determinación de cenizas solubles en agua

Al producto obtenido de las cenizas totales se colocó (15 mL) agua destilada, con el crisol tapado se llevó a ebullición en un reverbero por 5 minutos, la solución obtenida se filtró en un papel filtro libre de cenizas. Finalmente el producto contenido en el papel filtro se colocó en el crisol inicial, llevando a este nuevamente al proceso de carbonización en un reverbero e incineración en una mufla a 650°C por dos horas, al término del tiempo la muestra liquenácea contenida en el crisol se enfrió en el desecador y se pesó, reincidiendo este proceso hasta obtener un peso constante ($\pm 0.5\text{mg/g}$). Este ensayo se realizó por duplicado.

$$Ca = \frac{M_2 - Ma}{M_1 - M} \times 100$$

Figura 2-2: Fórmula de cenizas solubles en agua

Fuente: (VIDAURRE, Milagros., et al. 2010).

Donde Ca es el porcentaje de cenizas solubles en agua, M2 es la masa del crisol con las cenizas totales del liquen, Ma es la masa del crisol con las cenizas insolubles en agua del liquen, M1 es la masa del crisol con la muestra liquenácea, M es la masa del crisol tarado vacío y 100 es un factor matemático. (VIDAURRE, Milagros., et al. 2010, pp. 122-125).

2.1.3.3. Determinación de cenizas insolubles en ácido

Al producto obtenido de las cenizas totales se colocó (3 mL) ácido clorhídrico (10%), con el crisol tapado se llevó a baño hirviente por 12 minutos, a esta solución se añadió ácido nítrico y dos gotas de nitrato de plata (0.1 mol/L), para posteriormente filtrar con 3 lavados de agua destilada caliente en un papel filtro libre de cenizas.

El producto contenido en el papel filtro se colocó en el crisol inicial, llevando a este nuevamente al proceso de carbonización en un reverbero e incineración en una mufla a 650°C por dos horas, al término del tiempo la muestra liquenácea contenida en el crisol se enfrió en el desecador y se pesó, reincidiendo este proceso hasta obtener un peso constante ($\pm 0.5\text{mg/g}$). Este ensayo se realizó por duplicado. (VIDAURRE, Milagros., et al. 2010. pp. 122-125).

$$B = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

Figura 3-2: Fórmula de cenizas insolubles en ácido clorhídrico
Fuente: (VIDAURRE, Milagros., et al. 2010).

Donde B es el porcentaje de cenizas insolubles en ácido, M2 es la masa del crisol con la ceniza del líquen, M es la masa del crisol con la muestra de líquen y 100 es el factor.

2.1.3.4. Determinación de humedad

Se pesó (2 g) líquen seco y triturado en una cápsula de porcelana previamente tarada, se llevó a desecación en una estufa a una temperatura de 105°C por 3 horas, al término del tiempo la muestra liquenácea contenida en la cápsula se enfrió en el desecador y se pesó, nuevamente la cápsula se llevó a desecación durante una hora para luego enfriar y tomar el segundo peso, reincidiendo este proceso hasta obtener un peso constante ($\pm 0.5\text{mg/g}$). Este ensayo se realizó por duplicado.

$$Hg = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100$$

Figura 4-2: Fórmula de humedad
Fuente: (VIDAURRE, Milagros., et al. 2010).

Donde Hg es porcentaje de humedad, M2 es la masa de la cápsula con el contenido del liquen, M1 es la masa de la cápsula con el liquen desecado, M es la masa de la cápsula tarada vacía y 100 el factor. (VIDAURRE, Milagros., et al. 2010. pp. 122-125).

2.2. Estudio fitoquímico

2.2.1. Tamizaje fitoquímico

Partiendo de liquen (10 g) seco y triturado se procedió a realizar extracciones sucesivas en reflujo y calor (60 °C x 2 h) con éter etílico (60 mL), alcohol potable (60 mL) y agua (70 mL).

A cada uno de los extractos filtrados se realizó las respectivas pruebas de coloración y precipitación, que conforme a los metabolitos secundarios obtenidos de acuerdo a la solubilidad de los solventes de polaridad creciente que fueron utilizados nos ayudaron a la identificación de los compuestos presentes en *Parmelina tiliacea*.

Así el extracto etéreo fue dividido en seis fracciones para realizar los ensayos de: Sudan, Dragendorff, Mayer, Wagner, Baljet y Liebermann-Burchard, mientras que del extracto alcohólico se tomaron trece fracciones para los ensayos de: catequinas, resinas, Fehling, Baljet, Liebermann-Burchard, espuma, cloruro férrico, Borntrager, Shinoda, antocianidinas, Dragendorff, Mayer y Wagner, finalmente del extracto acuoso se tomó siete fracciones para los ensayos de: Dragendorff, Mayer, Wagner, cloruro férrico, Shinoda, Fehling, espuma, siguiendo así la marcha fitoquímica dada por Martínez M. & Cuellar Cuellar (1986, p.124). (VIDAURRE, Milagros., et al. 2010. pp. 122-125).

2.2.2 Obtención de los extractos de trabajo

Se pesó liquen (20 g) seco y triturado, los cuales se extrajeron a reflujo y calor con: acetato de etilo (280 mL), acetona (250 mL), alcohol potable (250 mL) y agua destilada (150 mL) con control de temperatura (60°C) por 2 horas. Los cuatro extractos obtenidos se filtraron y concentraron a sequedad en un evaporador rotatorio y se almacenaron a una temperatura de -4°C hasta el momento de su utilización. (KOSANIC, Marijana., et al. 2012. p. 2).

2.2.3. Análisis cromatográfico (Cromatografía en capa fina)

Los extractos liquenáceos de acetato de etilo, alcohol y cetona fueron procesados en placas de TLC de vidrio (10 cm x 4 cm) recubiertas de sílica gel con cinco sistemas de solventes de: cloroformo/acetato de etilo (60:40, v/v) ; tolueno/acetato de etilo/ácido fórmico (139:83:8, v/v) ; hexano/ éter etílico/ácido fórmico (130:80:20, v/v); tolueno/ácido acético (170:30, v/v) ; benceno/dioxano/ácido acético (36:9:1, v/v). (ELIX, Jhon. 2014. p. 5).

2.3. Actividad hemoaglutinante

2.3.1. Preparación de eritrocitos

Los tipos de sangre (A⁺, B⁺, AB⁺, O⁺) fueron lavados con solución fisiológica (NaCl 0.9%) en relación (1:3) y centrifugados en una centrífuga a 30 RPM por 3 minutos, este proceso se repitió hasta que se obtuvo una solución de lavado transparente, el precipitado producto del lavado (eritrocitos) se resuspendió al 5% en solución fisiológica (NaCl 0.9%), los eritrocitos de cada tipo de sangre fueron almacenados a 2°C. (SHINITI, Celso. 2007. p. 35).

2.3.2. Preparación del extracto acuoso liquénico

Extracto acuoso seco de *Parmelina tiliacea* (100 mg) se disolvió en (1 mL) agua estéril para obtener una solución de concentración 100mg/mL, luego fue homogeneizada en un vórtex por 2 minutos y almacenado a 2°C.

2.3.3. Ensayo de hemoaglutinación.

A tubos que contenían 100µL de diluciones seriadas (1/2 a 1/512) de extracto acuoso se añadió el mismo volumen de eritrocitos (suspendidos al 5%), se dejó reposar durante una hora para luego centrifugar en una centrífuga a 30 RPM por 3 minutos, en donde si se observa aglutinación el resultado es positivo con presencia de lectinas. Este proceso se repitió para los eritrocitos de cada tipo de sangre (A⁺, B⁺, AB⁺, O⁺) y por triplicado. (SHINITI, Celso. 2007. p. 35).

2.4. Actividad antimicrobiana

2.4.1. Microorganismos, medios de cultivo y fármacos antimicrobianos

Los siguientes microorganismos fueron utilizados para el análisis de la actividad antimicrobiana: *Klebsiela pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y *Candida albicans*, los microorganismos fueron obtenidos del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH. Los cultivos microbianos fueron mantenidos en pico de flauta de agar Mueller Hinton y agar Sabouraud (*Candida albicans*) hasta el momento de su activación, para lo cual se utilizó caldo soya tripticasa (*Candida albicans*) y cerebro corazón.

La sensibilidad de los microorganismos a las muestras liquenáceas fue analizada en agar Mueller Hinton para las cepas bacterias y agar Sabouraud para la cepa micótica. (NEDELJKO, Manojlovic, et al. 2012. p.1.).

Los antimicrobianos utilizados fueron: ceftriaxona (30 µg), eritromicina (15 µg) y Ketoconazol (25 µg) en discos de sensibilidad y ceftriaxona (1000 mg), eritromicina (500 mg) y Ketoconazol (250 mg) en fármacos de administración oral y parenteral.

2.4.2. Preparación de los extractos liquénicos

Los extractos secos de *Parmelina tiliacea* (300 mg) de acuerdo a la capacidad de solubilización que presentaron se disolvieron en DMSO y agua estéril en mayor o menor volumen (3 mL) para obtener una concentración de 100mg/mL.

Quedado de esta forma:

Los 300 mg de extracto seco de acetato de etilo se disolvieron en 3 mL de DMSO, los 300 mg de extracto seco acuoso se disolvieron en 1 mL DMSO y 2 mL de agua estéril, los 300 mg de extracto seco alcohólico se disolvió en 1 mL de alcohol con 2 mL de agua estéril, mientras que 300 mg de extracto cetónico se disolvió en 0.4 mL de DMSO y 2.6 mL de agua estéril.

Los extractos fueron homogeneizados en un vortex por 2 minutos y filtrados a través de un Millipore (Ø 25cm, 0.45 poro de nylon), de los extractos: cetónico y alcohólico se hicieron

diluciones, hasta ½ en el caso del extracto cetónico y hasta 1/100 en el caso del extracto alcohólico, todos estos fueron almacenados a -4°C hasta el momento de su utilización.

2.4.3. Ensayo de Esterilidad de extractos

Fue determinado en una placa Petri agarizada en la que se sembró una cepa de *Escherichia coli*, posteriormente se colocó (2 µL) cada extracto y se incubó en una estufa por 24 horas a 37°C.

2.4.4. Activación y acondicionamiento de cepas antimicrobianas.

De cada cepa antimicrobiana mantenida a 2°C en pico de flauta se tomó un pequeño inóculo y se activó en tubos con caldo soya tripticasa (*Candida albicans*) y caldo cerebro corazón para el resto de microorganismos en una estufa por 24 horas a 37°C. Al término de este tiempo las cepas activas fueron estandarizadas frente al patrón 0.5 McFarland a aproximadamente 1.5×10^8 CFU/mL. (KOSANIC, Marijana., et al. 2012. p.2).

2.4.5. Preparación de sustancias antimicrobianas

Los antimicrobianos ceftriaxona (1000 mg), eritromicina (500 mg) y Ketoconazol (250 mg) en fármacos de administración oral y parenteral, fueron preparados a soluciones de igual concentración en la que se encuentran los discos antimicrobianos comerciales es decir: ceftriaxona (30 µg), eritromicina (15 µg) y ketoconazol (25 µg) para lo cual fueron filtrados a través de un Millipore (Ø 25cm, 0.45 poro de nylon) y almacenados a 2°C hasta el momento de su utilización.

2.4.6. Ensayo antimicrobiano- Método de microgotas

En placas Petri agarizadas (Mueller Hinton y Saboraud) se estirió una concentración estandarizada (0.5 McFarland) de cada una de las cepas activas en estudio, se colocó (2 µL) cada extracto con sus respectivas diluciones, control de solventes (Agua estéril, DMSO) y control de antimicrobianos por triplicado, para lo cual se utilizó una plantilla numerada que ayudó en la colocación e identificación de cada microgota, esto se incubó en una estufa por 24 horas a 37°C.

2.4.7. Ensayo antimicrobiano- Método de difusión de discos

En placas Petri de agar (Mueller Hinton y Saboraud) sembradas (0.5 McFarland) cada una de las cepas activas en estudio, se colocó discos de papel filtro (\varnothing 5 mm), con la ayuda de una plantilla numerada, sobre cada disco se secó (15 μ L) extractos y sus respectivas diluciones, control de solventes (Agua estéril, DMSO) y control de antimicrobianos por triplicado, esto se incubó en una estufa por 24 horas a 37°C. (PERRI, Nigel., et al. 1999. p. 629).

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

3.1. Muestras liquenáceas

Tabla 1-3: Resultados obtenidos de parámetros de control de calidad de la droga seca y triturada de *Parmelina tiliacea*

PARÁMETRO	DATOS OBTENIDOS (%)	REFERENCIA (%)
Humedad	8	8-14
Cenizas Totales	11	11
Cenizas solubles en agua	9	15
Cenizas insolubles en ácido	2	3

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

Los parámetros de control de calidad de la muestra liquenácea se compararon con valores de referencia establecidos por la FEUM, para drogas vegetales, al ser la única fuente de información hallada, ya que no hay valores específicos para líquenes. Como se muestra en la Tabla 1-3 los parámetros de calidad: humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua e insolubles en ácido se encontraron dentro de los valores establecidos, cabe recalcar que estos datos son de ayuda para valorar la calidad y pureza de las muestras tomadas, ya que una muestra con alto contenido de humedad es susceptible al ataque microbiano, investigaciones indican que muestras con un porcentaje de humedad de 15-30% serán blanco de hongos y bacterias, mientras que las cenizas muestran la cantidad de minerales que componen de forma natural al líquen, ya que son considerados como bioindicadores ambientales y en sus estructuras captan cierto porcentaje de metales del ambiente, razón por la que su valor está en el límite. (FEUM, 2014. pp.27).

3.2. Análisis fitoquímico

3.2.1. Tamizaje fitoquímico

Tabla 2-3: Resultados del tamizaje fitoquímico del líquen *Parmelina tiliacea*.

TIPO DE EXTRACTO	ENSAYO	RESULTADO
Etéreo	Sudán	(+)
	Dragendorff	(-)
	Mayer	(-)
	Wagner	(-)
	Baljet	(-)
	Liebermann-Burchard	(++)
Alcohólico	Catequinas	(-)
	Resinas	(-)
	Fehling	(-)
	Baljet	(-)
	Liebermann-Burchard	(++)
	Espuma	(-)
	Cloruro férrico	(+++)
	Borntrager	(-)
	Shinoda	(-)
	Antocianidinas	(-)
	Dragendorff	(-)
	Mayer	(-)
	Wagner	(-)
Acuoso	Fehling	(-)
	Baljet	(-)
	Liebermann-Burchard	(++)
	Espuma	(-)
	Cloruro férrico	(+++)
	Borntrager	(-)
	Shinoda	(-)
	Dragendorff	(-)
	Mayer	(-)
Wagner	(-)	

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

Los resultados del tamizaje fitoquímico presentados en la Tabla 2-3, evidencia la presencia de: compuestos grasos, triterpenos y compuestos fenólicos, ya que al extraer sucesivamente la muestra seca y triturada de *Parmelina tiliacea* con solventes de polaridad creciente las pruebas de: Sudán, Liebermann-Burchard y Cloruro férrico fueron positivas, dando mayor intensidad de respuesta en la prueba de cloruro férrico, lo que coincide con los reportes de la composición fitoquímica de otras familias de líquen, en donde demuestran que los compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios más abundantes, compuestos fenólicos como: fenoles mononucleares, quinonas, dibenzofuranos, depsidones, depsides, depsones, G-lactonas y xantonas. (YOUSUF, Sammer., et al. 2014. pp. 226-232).

3.2.2. Análisis cromatográfico

La figura 1-3 muestra cinco cromatografías corridas con cinco sistemas de solventes diferentes: tolueno/acetato de etilo/ácido fórmico (139:83:8, v/v); tolueno/ácido acético (170:30, v/v); benceno/dioxano/ácido acético (36:9:1, v/v); cloroformo/acetato de etilo (60:40, v/v); hexano/éter etílico/ácido fórmico (130:80:20, v/v) (izquierda-derecha).

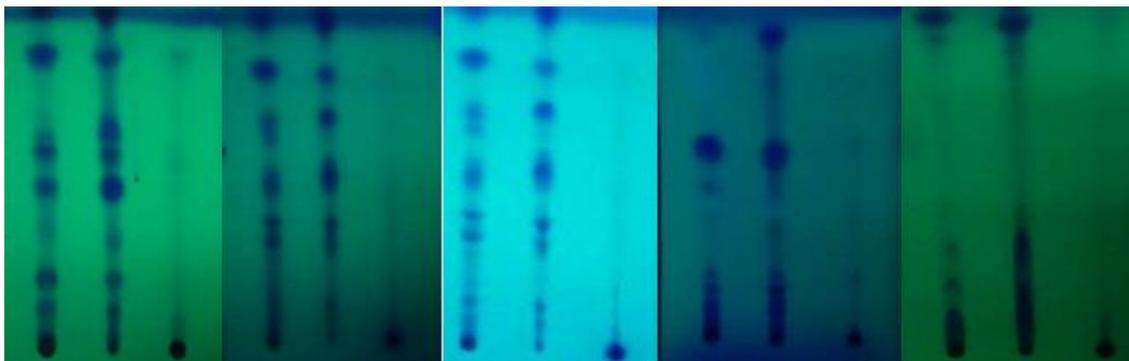


Figura 1-3: Cromatografías en capa fina vista con luz UV de onda corta de los extractos alcohólico, acetato de etilo y cetónico (izquierda-derecha) del líquen *Parmelina tiliacea*.
Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

Los sistemas de solventes enunciados en la Figura 1-3 de acuerdo Elix (2014, pp. 5-8) son los cinco sistemas de solventes más usados en estudios fitoquímicos sobre líquenes, aunque como se puede observar en las imágenes solo los 3 primeros sistemas de solventes: tolueno/acetato de etilo/ácido fórmico (139:83:8, v/v); tolueno/ácido acético (170:30, v/v); benceno/dioxano/ácido acético (36:9:1, v/v) generan una buena eficiencia, eficacia y resolución de los componentes líquénicos presentes en *Parmelina tiliacea*, esto debido a la naturaleza de los solventes que permiten la elución de los compuestos, aunque el sistema conformado por : benceno/dioxano/ácido acético (36:9:1, v/v) usado para la separación de depsidos y depsidones hoy se encuentra en desuso por la toxicidad que representan.

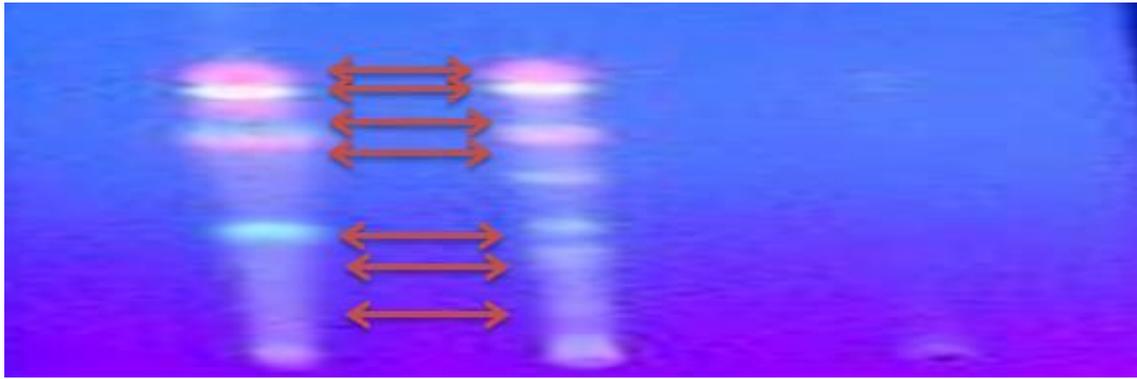


Figura 2-3: Cromatografía en capa fina, luz UV de onda larga de los extractos alcohólico, acetato de etilo y cetónico (izquierda-derecha) del líquen *Parmelina tiliacea* procesado con el sistema de solventes: tolueno/acetato de etilo/ácido fórmico (139:83:8, v/v).

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

Tabla 3-3: Resultados de la cromatografía en capa fina de los extractos del líquen *Parmelina tiliacea*

Rf extracto Alcohólico	Rf extracto acetato de etilo	Rf extracto cetónico	Rf Referencial	Posible compuesto
0,88	0,90	-	0,86	Ácido pulvínico
0,76	0,79	-	0,78	Atranorina
0,65	0,67	-	0,64	Argopsina
0,53	0,59	-	0,58	Ácido anziaico
0,40	0,42	-	0,40	Ácido acaranoico
0,33	0,31	-	0,34	Ácido acarenoico
0,21	0,20	0,19	0,22	Ácido cryptostígico

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

La tabla 3-3 muestra los Rf de los siete compuestos identificados en las cromatografías realizadas, de los cuales se presume corresponden a: ácido pulvínico, atranorina, Argopsina, ácido anziaico, ácido acaranoico, ácido acarenoico, ácido cryptostígico, según los valores Rf referenciales tomados de un catálogo estandarizado de cromatografías de extractos liquénicos. (ELIX, John. 2014. pp.15-250).

3.3. Actividad hemoaglutinante

Tabla 4-3: Resultados de la primera réplica de la actividad hemoaglutinante del extracto acuoso del líquen *Parmelina tiliacea*.

ERITROCITOS (Tipos de sangre)	*HEMAGLUTINACIÓN						
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
A ⁺	++	++	++	+	+	+	0
B ⁺	++	++	++	++	+	+	+
AB ⁺	++	++	++	++	+	+	+
O ⁺	0	0	0	0	0	0	0

*D = Dilución del extracto acuoso D1= dilución 1/2, D2= dilución 1/4, D3= dilución 1/8, D4= dilución 1/16, D5= dilución 1/32, D6= dilución 1/64, D7= dilución 1/128. 0= no actividad, += baja actividad, ++ = mediana actividad.

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

Tabla 5-3: Resultados de la segunda réplica de la actividad hemoaglutinante del extracto acuoso del líquen *Parmelina tiliacea*.

ERITROCI TOS (TIPO DE SANGRE)	*HEMAGLUTINACIÓN								
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
A ⁺	++	++	++	+	+	+	0	0	0
B ⁺	++	++	+	+	+	+	0	0	0
AB ⁺	++	++	++	++	+	+	+	+	0
O ⁺	++	++	++	++	++	++	++	+	+

*D = Dilución del extracto acuoso D1= dilución 1/2, D2= dilución 1/4, D3= dilución 1/8, D4= dilución 1/16, D5= dilución 1/32, D6= dilución 1/64, D7= dilución 1/128, D8= dilución 1/256, D9= dilución 1/512. 0= no actividad, += baja actividad, ++ = mediana actividad.

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

Tabla 6-3: Resultados de la tercera réplica de la actividad hemoaglutinante del extracto acuoso del líquen *Parmelina tiliacea*.

ERITROCITOS (TIPO DE SANGRE)	*HEMAGLUTINACIÓN								
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
A ⁺	++	++	++	++	+	+	0	0	0
B ⁺	++	++	++	+	+	+	+	0	0
AB ⁺	++	++	++	++	+	+	+	0	0
O ⁺	++	++	++	++	++	++	+	+	+

*D = Dilución del extracto acuoso D1= dilución 1/2, D2= dilución 1/4, D3= dilución 1/8, D4= dilución 1/16, D5= dilución 1/32, D6= dilución 1/64, D7= dilución 1/128, D8= dilución 1/256, D9= dilución 1/512. 0= no actividad, += baja actividad, ++ = mediana actividad.

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

La intensidad del efecto aglutinante está representado mediante el número de cruces, (+) baja actividad, (++) mediana actividad, (+++) alta actividad y (0) no presenta actividad, este efecto fue evaluado mediante la capacidad del extracto acuoso del líquen *Parmelina tiliacea* y sus diluciones para aglutinar eritrocitos de diferentes tipos de sangre. Como se muestra en las Tablas 4-3, 5-3 y 6-3- la actividad se realizó por triplicado, en la primera replica Tabla 4-3 se visualiza que, ninguna de las diluciones del extracto acuoso del líquen aglutinó los eritrocitos del grupo O⁺, resultados que difieren de la segunda y tercera réplica, revelando que durante la primera ejecución del ensayo se cometieron errores en la metodología.

Los resultados de las Tablas 5-3 y 6-3 segunda y tercera réplica son muy similares, los extractos aglutinaron los eritrocitos de todos los grupos sanguíneos, solo se diferenció en la intensidad de aglutinación, evidenciando de esta manera la presencia de lectinas en el líquen *Parmelina tiliacea*, puesto que estas glicoproteínas al unirse con los eritrocitos aglutinan su estructura. (SHINITI, Celso. 2007. p. 7).

La aglutinación presentada es mediana, en comparación con extractos de leguminosas, donde la concentración de lectinas es alta, la intensidad de aglutinación tuvo una relación inversa, entre más diluyo el extracto, menor actividad aglutinante presentó, así tenemos que en los eritrocitos del grupo A⁺ hubo actividad hasta la dilución 1/64, en los eritrocitos del grupo B⁺ hasta la dilución 1/128, en los eritrocitos del grupo AB⁺ hasta la dilución 1/256 y en los eritrocitos del grupo O⁺ hasta la dilución 1/512, teniendo las lectinas líquénicas alta especificidad por este grupo, la especificidad de unión a uno u otro eritrocito, está en dependencia de la composición de membrana de cada eritrocito y además de la misma especificidad de la lectina por algún azúcar. (SHARON, N. 1989. pp. 27-39)

La presencia de las lectinas en líquenes ya se encuentra evidenciada en bibliografía, siendo estas glicoproteínas de origen fúngico, aunque su enfoque está dirigido más al mecanismo de reconocimiento que presentan como moléculas de señalización, y ya se ha tratado de elucidar su secuencia de aminoácidos, más no se ha probado como terapia contra el cáncer. (SAN CRISTOBAL, Mara. 2010. pp. 13-16).

3.4. Actividad antimicrobiana

Tabla 7-3: Datos de esterilidad de los extractos

TIPO DE EXTRACTO	*ESTERILIDAD
Alcohólico	0
Cetónico	0
Acetato de etilo	0
Acuoso	0

*0= ausencia de microorganismos, 1= presencia de microorganismos

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015

No hubo presencia de microorganismos en los extractos, estos fueron llevados a sequedad con un evaporador rotatorio y congelados hasta el momento de su utilización, razón por lo que no existió un medio que permitiera la proliferación de microorganismos y la temperatura de congelación ralentizó la acción de las enzimas y detuvo los procesos metabólicos, impidiendo así los procesos de degradación en el extracto. (ORDOÑEZ., et al. 2007. Pp. 194-291).

3.4.1. Método de microgotas

Tabla 8-3: Actividad antimicrobiana del control de solventes

*MICROORGANISMOS	*ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	
	AGUA	DMSO
<i>S. a.</i>	0	6
<i>E. c.</i>	0	0
<i>K. p.</i>	0	0
<i>P.m.</i>	0	0
<i>P. a.</i>	0	0
<i>C. a.</i>	0	0

**S. a.*=*Staphylococcus aureus*, *E. c.*=*Escherichia coli*, *K. p.*=*Klebsiella pneumoniae*, *P.m.*=*Proteus mirabilis*, *P.a.*=*Pseudomonas aeruginosa*, *C. a.*=*Candida albicans*.

*Promedio del diámetro de la zona de inhibición en mm del ensayo realizado por triplicado.

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

Tabla 9-3: Actividad antimicrobiana del control de antibióticos

*MICROORGANIS MOS	*ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA		
	Ceftriaxona (30 µg)	Eritromicina (15 µg)	Ketoconazol (25 µg)
<i>S. a.</i>	12	16	0
<i>E. c.</i>	20	0	0
<i>K. p.</i>	14	6	0
<i>P.m.</i>	31	0	0
<i>P. a.</i>	10	0	0
<i>C. a.</i>	0	0	0

*S. a.=*Staphylococcus aureus*, E. c.= *Escherichia coli*, K. p.= *Klebsiella pneumoniae*, P.m.= *Proteus mirabilis*, P.a.= *Pseudomonas aeruginosa*, C. a.= *Candida albicans*.

*Promedio del diámetro de la zona de inhibición en mm del ensayo realizado por triplicado.

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

Tabla 10-3: Actividad antimicrobiana de los extractos de *Parmelina tiliacea*

*MICROORGANISMOS	*ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA							
	EC1	EC2	EA1	EA2	EA3	EA4	EAT	EAC
<i>S. a.</i>	7	0	7	7	6	0	9	0
<i>E. c.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>K. p.</i>	6	0	6	6	6	6	0	0
<i>P.m.</i>	0	0	7	7	6	0	0	0
<i>P. a.</i>	0	0	6	6	6	0	0	0
<i>C. a.</i>	0	0	0	0	0	0	0	6

*S. a.=*Staphylococcus aureus*, E. c.= *Escherichia coli*, K. p.= *Klebsiella pneumoniae*, P.m.= *Proteus mirabilis*, P.a.= *Pseudomonas aeruginosa*, C. a.= *Candida albicans*.

*EC1= Extracto cetónico sin diluir, EC2= Extracto cetónico 1/4, EA1= Extracto alcohólico sin diluir, EA2= Extracto alcohólico 1/4, EA3= Extracto alcohólico 1/10, EA4= Extracto alcohólico 1/100, EAT= Extracto de acetato de etilo sin diluir, EAC= Extracto acuoso.*Promedio del diámetro de la zona de inhibición en mm del ensayo realizado por triplicado.

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

3.4.2. Método de difusión de discos

Tabla 11-3: Actividad antimicrobiana del control de solventes

*MICROORGANISMOS	*ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	
	AGUA	DMSO
<i>S. a.</i>	0	7
<i>E. c.</i>	0	0
<i>K. p.</i>	0	6
<i>P.m.</i>	0	0
<i>P. a.</i>	0	0
<i>C. a.</i>	0	0

**S. a.*=*Staphylococcus aureus*, *E. c.*= *Escherichia coli*, *K. p.*= *Klebsiella pneumoniae*, *P.m.*= *Proteus mirabilis*, *P.a.*= *Pseudomonas aeruginosa*, *C. a.*= *Candida albicans*.

*Promedio del diámetro de la zona de inhibición en mm del ensayo realizado por triplicado.

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

Tabla 12-3: Actividad antimicrobiana del control de antibióticos

*MICROORGANISMOS	*ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA					
	CDC (30 µg)	CT (30µg)	EDC (15 µg)	ET (15µg)	KDC (25 µg)	KT (25 µg)
<i>S. a.</i>	20	21	27	25	0	0
<i>E. c.</i>	27	30	11	0	0	0
<i>K. p.</i>	20	25	9	0	0	0
<i>P.m.</i>	40	46	0	0	0	0
<i>P. a.</i>	17	20	0	0	0	0
<i>C. a.</i>	0	0	0	0	0	0

**S. a.*=*Staphylococcus aureus*, *E. c.*= *Escherichia coli*, *K. p.*= *Klebsiella pneumoniae*, *P.m.*= *Proteus mirabilis*, *P.a.*= *Pseudomonas aeruginosa*, *C. a.*= *Candida albicans*.

* CDC = ceftriaxona disco comercial, CT= ceftriaxona taza, EDC= eritromicina disco comercial, ET= eritromicina taza, KDC= ketoconazol disco comercial, KT= ketoconazol taza.

*Promedio del diámetro de la zona de inhibición en mm del ensayo realizado por triplicado.

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

Tabla 13-3: Actividad antimicrobiana de los extractos de *Parmelina tiliacea*

*MICROORGANISMOS	*ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA							
	EC1	EC2	EA1	EA2	EA3	EA4	EAT	EAC
<i>S. a.</i>	9	0	9	8	7	0	13	0
<i>E. c.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>K. p.</i>	8	0	8	7	6	6	0	0
<i>P.m.</i>	0	0	9	8	6	0	0	0
<i>P. a.</i>	0	0	8	7	6	0	0	0
<i>C. a.</i>	0	0	0	0	0	0	0	6

*S. a.=*Staphylococcus aureus*, E. c.= *Escherichia coli*, K. p.= *Klebsiella pneumoniae*, P.m.= *Proteus mirabilis*, P.a.= *Pseudomonas aeruginosa*, C. a.= *Candida albicans*.

*EC1= Extracto cetónico sin diluir, EC2= Extracto cetónico 1/4, EA1= Extracto alcohólico sin diluir, EA2= Extracto alcohólico 1/4, EA3= Extracto alcohólico 1/10, EA4= Extracto alcohólico 1/100, EAT= Extracto de acetato de etilo sin diluir, EAC= Extracto acuoso.*Promedio del diámetro de la zona de inhibición en mm del ensayo realizado por triplicado.

Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

La actividad antimicrobiana fue testada por dos métodos: método de microgotas y el método de difusión de discos. Los resultados de la actividad de los extractos del líquen contra los microorganismos del ensayo, utilizando el primer método se muestran en las Tablas 8-3, 9-3 y 10-3, las mediciones de los halos en este método fueron difíciles de tomar, debido a que por el pequeño volumen (5µL) que se pipeteó, no hubo una buena resolución de los halos.

Los resultados de la Tabla 10-3 mostraron actividad antimicrobiana, siendo mayor el efecto antibacteriano que el antifúngico, de acuerdo con Vertia (2001, p. 235) el potencial antimicrobiano depende mucho del género del líquen, del solvente utilizado para la extracción de sus componentes y de las cepas microbianas contra las que se vaya a analizar. Razones por la que existe diferencia de resultados, así, todos los extractos fueron activos para algún tipo de microorganismo, excepto a la bacteria *Escherichia coli*, bacteria Gram negativa de compleja estructura celular y muy poca permeabilidad, dato que coincide con investigaciones en las que, ningún extracto liquenáceo inhibe el crecimiento de esta bacteria. Aunque en general las bacterias Gram negativas por la composición de su pared celular (peptidoglicano, lipopolisacáridos y lipoproteínas) son difíciles de atacar. (NEDELJKO, Manojlovic, et al. 2012. p.1.).

Según la intensidad del efecto, el extracto de acetato de etilo, inhibe más el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Ø inhibición = 9mm) resultado comparable con un artículo de Sáenz (2006, p. 158), seguido del extracto cetónico sin diluir y el extracto alcohólico activo hasta la dilución 1/10, mientras que para *Klebsiella pneumoniae* los extractos: cetónico, alcohólico hasta

dilución 1/10 son los que impiden su crecimiento. Para las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis* solo los extractos alcohólicos hasta dilución 1/ 10 fueron activos. (SÁENZ, M., et al. 2006. p. 158).

Todo lo contrario evidenció la cepa micótica de *Candida albicans* donde el extracto acuoso fue el que presentó efecto inhibitorio. El efecto antimicrobiano fue comparado con estándares de antibióticos, ceftriaxona (30 µg), eritromicina (15µg) para bacterias y Ketoconazol (25µg) para la cepa fúngica, como se muestra en la Tabla 9-3, estos estándares tuvieron mayor efecto antimicrobiano (mayor \varnothing de inhibición) que los extractos liquenáceos. Para los controles negativos DMSO y agua, solo el primero tuvo un pequeño efecto en *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*, efecto menor no comparable con el efecto inhibitorio causado por los extractos del líquen *Parmelina tiliácea* mostrados en la Tabla 8-3. (PERRY, B., et al. 1999. pp. 45-67).

Todos estos resultados son similares a los obtenidos por el método de difusión de discos, mostrados en las Tablas 11-3, 12-3 y 13-3, donde las únicas diferencias son: la intensificación del efecto, y la mejor resolución de los halos de inhibición, debido al aumento de volumen de las sustancias testadas.

En este método se realizó una comparación entre la actividad de los discos antimicrobianos comerciales, con los discos elaborados durante el Trabajo de titulación Tabla 12-3, en donde se obtuvo buenos resultados, pues los diámetros de inhibición eran estadísticamente iguales, y el resultado de inhibición era el mismo reportado en bibliografía para cada cepa microbiana. (PICAZO, Juan. 2000. pp. 11-17).

Finalmente con la difusión de discos, se evidenció, que el efecto antimicrobiano de los extractos Tabla 13-3 eran mayor que al del DMSO Tabla 11-3 y próximo al de los antimicrobianos Tabla 12-3.

CONCLUSIONES

Los parámetros fisicoquímicos de calidad: humedad, cenizas totales, solubles en agua e insolubles en ácido, obtenidos del líquen seco y triturado se encontraron dentro de los valores de referencia establecidos por la FEUM.

Dentro del estudio fitoquímico se detectó mediante tamizaje que, los extractos etéreo, alcohólico y acuoso presentan sustancias de naturaleza grasa, triterpenos y compuestos fenólicos, resultados que concuerdan con la cromatografía corrida con el sistema de solventes: tolueno/acetato de etilo/ácido fórmico (139:83:8, v/v), que fue la que obtuvo mejor eficacia, eficiencia y resolución, dando la presencia de siete compuestos de los cuales en comparación con sus Rf se presumen que son: ácido pulvínico, atranorina, Argopsina, ácido anziaico, ácido acaranoico, ácido acarenoico, ácido cryptostíptico.

Con la respuesta aglutinante que generó el extracto acuoso del líquen *Parmelina tiliacea* se estableció que existe la presencia de lectinas dentro de su estructura, a pesar de no tener un alto contenido de estas glicoproteínas según la intensidad del efecto hemoaglutinante que presentó, la duración del efecto dependió de la concentración del extracto y el tipo de hematíe (grupo sanguíneo), siendo los hematíes del grupo O⁺ quienes aglutinaron aún en bajas en concentraciones del extracto.

Se demostró que los extractos cetónico, alcohólico, acetato de etilo y acuoso del líquen *Parmelina tiliacea* tienen efecto antimicrobiano *in vitro* contra: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y *Cándida albicans*, pero no contra la cepa *Escherichia coli*, estudios realizados por Yang (1999. pp. 50), demostraron que las bacterias son más sensibles que los hongos a esta actividad debido a diferencias en composición y permeabilidad, de igual manera existe diferencia entre Gram positivos y negativos, siendo los Gram positivos más susceptibles a la acción inhibitoria.

La elección de uno de los extractos para catalogarlo como el de mayor efecto no se puede dar, pues hay varios factores inmersos, pero se puede concluir que la naturaleza del solvente, juega mucho en favor a la acción antimicrobiana, siendo más efectivo utilizar solventes de tipo apolar, debido a que gran parte de las sustancias líquénicas presentan también esta naturaleza.

RECOMENDACIONES

Realizar un estudio de la actividad fotoprotectora del líquen *Parmelina tiliacea* ya que, los compuestos fenólicos actúan como filtro de luz, respuesta que genera para su misma protección contra la radiación, así evita el fotoblanqueamiento de las algas por oxidación de la clorofila.

Una investigación exhaustiva de las lectinas líquénicas presentes en *Parmelina tiliacea*, sería de gran aporte. Aislarlas, purificarlas, estudiar su composición aminoacídica y el efecto anticancerígeno sobre líneas celulares.

Un estudio antimicrobiano de los compuestos fraccionados del líquen, también ayudaría a determinar cuál de las sustancias es la causante del efecto o si este se debe a una acción sinérgica entre ellos.

BIBLIOGRAFÍA

ANDERSON, R. *Infectious diseases of humans*. 2^{da} ed. Oxford, Inglaterra . Press S.A. 1991. pp.6-8.

BRANDAN, Nora., et al. Respuesta inmunitaria. *Scielo*, vol.21, Nº3 (2007), (Argentina) pp. 1-8.

CASTILLO, Adriana., et al. Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *RIC*, vol.57, Nº1 (2005), (Colombia) pp. 55-64.

DELGADO, Antonio., et al. *Introducción a la química terapéutica*. 2^{da}ed. Barcelona, España. ELSEVIER. 2000. pp. 50-65.

ELIX, John. *A catalogue of standardized chromatographic data and biosynthetic relationships for lichen substances*. 3^{era}ed. Canberra, Australia. ANU. 2014. pp.5-8.

GOODMAN, L., et al. *Base farmacológica de la terapéutica*. 5^aed. New York,USA. MacMillan. 1975. pp. 25-45.

GUZMÁN, L., et al. Bacterias patógenas en infecciones del tracto respiratorio. *Scielo*, vol.33, Nº1 (2005), (Venezuela) pp. 2-3.

HERNANDEZ, Patricia., et al. Aplicaciones de las lectinas. *Hematol*, vol.22, Nº1 (1999), (Cuba) pp. 91-94.

INEC. *Registro de tumores SOLCA MATRIZ*. [En línea]. Ecuador: INEC, 2013. [Consulta: 16 Septiembre 2015.] Disponible en: <<http://www.estadisticas.med.ec/webpages/graficos.jsp>>

JAWETZ., et al. *Microbiología médica*. 25^aed. México, D.F. McGrawHill. 2011. pp. 63-70.

KOSANIC, Marijana., et al. Evernia prunastri and Pseudoevernia furfuraceae lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food and chemical toxicology*, vol.13, Nº3 (2012), (Serbia) p. 2.

MARCANO, Deanna., et al. *Fitoquímica orgánica*. 2^{da}ed. Caracas-Venezuela. Ciencias. 2002. pp. 60-62.

MURRAY, Patrick., et al. *Microbiología médica*. 6^{ta}ed. Barcelona-España. Elsevier. 2009. pp. 9-23.

OMS. *Enfermedades diarreicas*. [En línea]. Ecuador: OMS, 2013. [Consulta: 7 Septiembre 2015.] Disponible en: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>>

ORDOÑEZ., et al. *Tecnología de los alimentos*. 1^{era}ed. Madrid-España. Elsevier. 2007. pp. 194-291.

PICAZO, Juan. *Métodos básicos para el estudio de sensibilidad de antimicrobianos*. [En línea]. Chile: Cantón, Rafael, 2000. [Consulta: 14 Septiembre 2015.] Disponible en: <<http://coesant-seimc.org/>>

PELCZAR, Michael., et al. *Microbiología*. 4^{ta}ed. México. McGraw-Hill. 1982. pp. 12-56.

PERRI, Nigel., et al. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zealand lichens. *Lichenologist*, vol.13, (1999), (Nueva Zelanda) p. 629.

RANKOVIC, Branislav. Metabolitos secundarios de líquenes. *Elsevier*, (2015), (Suiza) pp. 1-10.

ROSENTERETER, Roger, et al. A field guide to biological soil crusts of Western U.S. Drylands. Common lichens and bryophytes. *Hematol*, (2007), (USA) p. 7.

RUIZ, V., et al. *Tratado de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Madrid, España. Panamericana. 2005. pp. 10-16.

SAÉNZ, M., et al. Antimicrobial activity and phytochemical studies of some lichens from south of Spain. *Elsevier*, vol.21, Nº1, 2006, Sevilla-España. pp. 158-160.

SANCHEZ, Carlos. *Enfermedad diarreica aguda*. [En línea]. Ecuador: Sánchez, Carlos, 2014. [Consulta: 7 Septiembre 2015.] Disponible en: <<http://www.aibarra.org/Guias/5-12.htm>>

SANOFI. *Gastropediatria*. [En línea]. Ecuador: Castro, R, 2013. [Consulta: 11 Mayo 2015.]
Disponible en: <<http://www.sanofi.com.ec/l/ec/sp/layout.jsp?scat=56B67321-AACE-4BBD-9B84-83932DD36F11>>

SHINITI, Celso. *Estudios estructurales de lectinas de algas marinas y de vegetales superiores* (Tesis Doctoral). Universidad de Valencia, Valencia, España. 2007. p. 35.

VANACLOCHA, Bernat., et al. *Fitoterapia*. 4^{ta}ed. Barcelona-España. Elsevier. 2003. Pp. 29-31.

VIDAURRE, Milagros., et al. Características farmacognósticas de las hojas de *Capparis avicennifolia*. *Vallejiana*, (2007), (Cuba) pp. 122-125.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *World health statistics*. USA. 2015. p. 55.

YOUSUF, Sammer., et al. *Química y propiedades biológicas del líquen*. Jeddah, Arabia Saudita. Elsevier. 2014. pp. 223-240.

ANEXOS

ANEXO A: Recolección y acondicionamiento del líquen



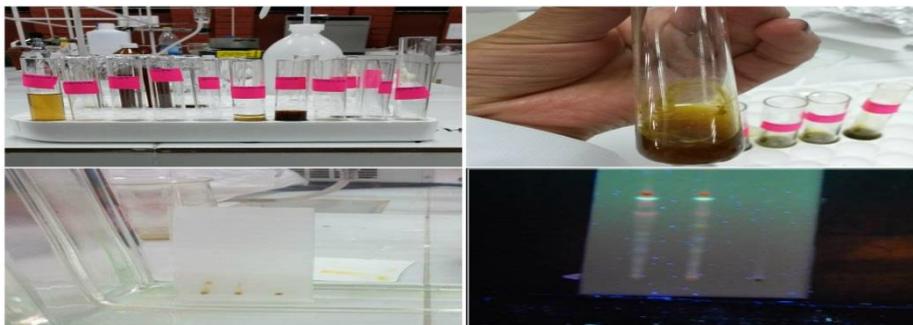
Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

ANEXO B: Control de calidad del líquen y obtención de extractos



Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

ANEXO C: Análisis fitoquímico de *Parmelina tiliácea* (tamizaje fitoquímico, TLC)



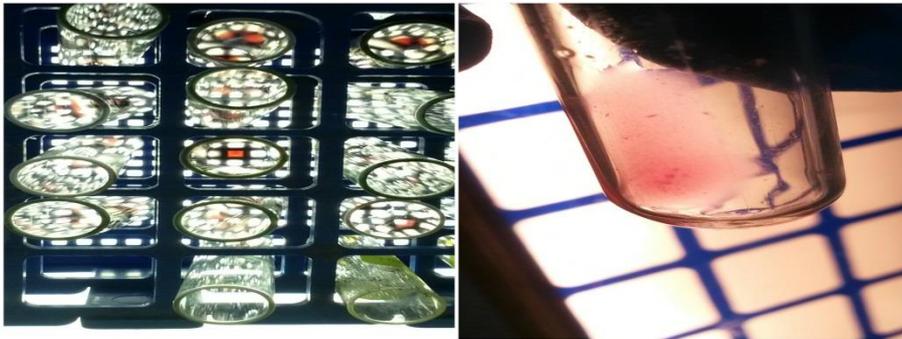
Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

ANEXO D: Prueba de hemaglutinación (Preparación de hematíes y extracto liquénico)



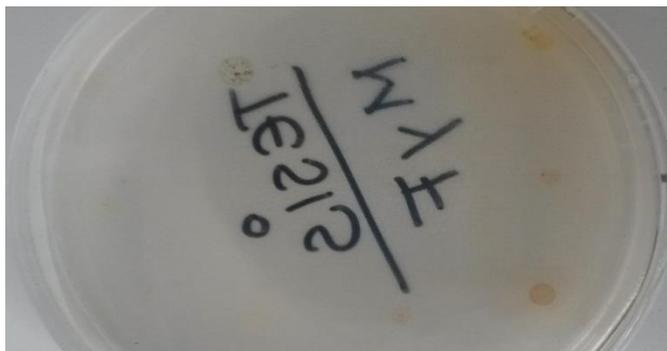
Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

ANEXO E: Resultado hemaglutinación (Formación de pequeños gránulos)



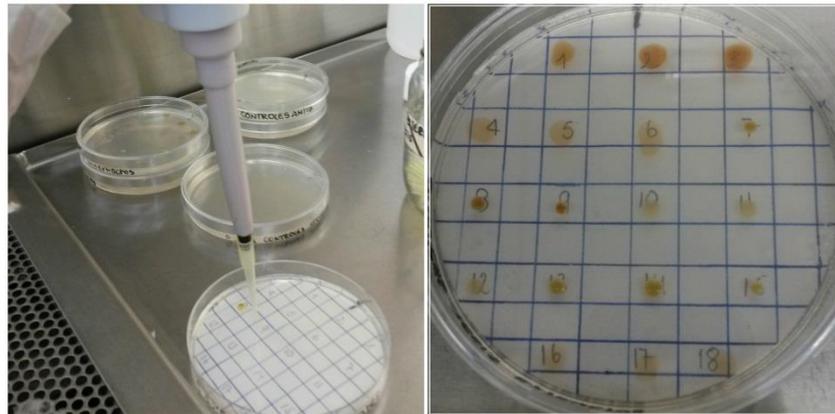
Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

ANEXO F: Control de esterilidad de extractos



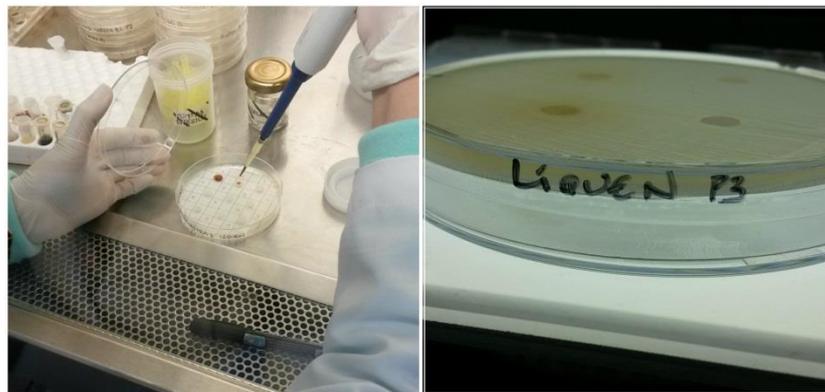
Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

ANEXO G: Estudio antimicrobiano-método microgotas



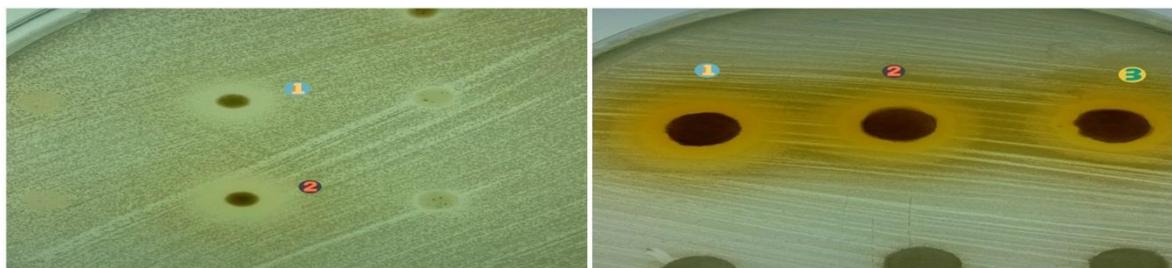
Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

ANEXO H: Estudio antimicrobiano-Método de difusión de discos



Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.

ANEXO I: Sensibilidad de *Staphylococcus aureus* al extracto de acetato de etilo. Método de microgota-Método de difusión de disco. (Izq.-derecha)



Realizado por: CHICAIZA, M. 2015.